

**Die Hitzeschockantwort oberhalb des Siedepunktes von Wasser:  
Funktion und Struktur des neuartigen Transkriptionsregulators  
Phr aus *Pyrococcus furiosus***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Gudrun Vierke**  
aus Husum

Regensburg, im Februar 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.02.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Thomm

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. M. Thomm
	2. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. R. Sterner
	3. Prüfer:	Prof. Dr. H. Tschochner

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
1. Bakterienstämme.....	17
2. Plasmide .....	17
3. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien .....	17
3.1 Enzyme und andere Proteine.....	17
3.2 Chemikalien .....	18
4. Oligonukleotide.....	20
5. Kultivierung von <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	21
6. Konstruktion des Plasmids <i>upphr</i> .....	21
7. <i>In vitro</i> -Transkription .....	22
8. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs).....	22
8.1 EMSA mit radioaktiv markierter DNA .....	22
8.2 EMSA mit fluoreszenz markierter DNA.....	23
9. Primer Extension.....	23
10. DNaseI-Footprints.....	24
11. Western Blot .....	25
12. <i>In vivo</i> Crosslinking Versuche.....	26
12.1 Formaldehydfixierung von Phr-DNA-Komplexen und Chromatinimmun- präzipitation (ChIP).....	26
12.2 Analyse der Präzipitate durch spezifische PCR .....	28
12.3 Präparation der präzipitierten DNA für genomweite Analyse (ChIP to chip) .....	29
12.3.1 Auffüllreaktion der überhängenden DNA-Enden .....	29
12.3.2 Präparation und Ligation von DNA-Linkern an die präzipitierte DNA.....	30

12.3.3	Linkervermittelte PCR .....	30
<b>13.</b>	<b>Konstruktion von Phr-Varianten zur Struktur- und Funktionsaufklärung .....</b>	<b>33</b>
13.1	Selenomethionin-Markierung von Phr .....	33
13.2	Herstellung einer verkürzten Variante von Phr (Phr <sub>AS 1-96</sub> ).....	34
13.3	Phr mit C-terminalem His-Tag.....	35
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
<b>1.</b>	<b>Sequenzanalyse von Phr .....</b>	<b>36</b>
<b>2.</b>	<b>Phr reguliert die Transkription von Hitzeschockgenen, einschließlich die seines eigenen Gens, <i>in vitro</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Hitzeschockgene.....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Phr-Bindung <i>in vitro</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Phr bindet an den <i>aaa</i><sup>+</sup><i>atpase</i>-Promotor und verhindert die Anlagerung der RNA-Polymerase .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Bindung von Phr an weitere Promotoren .....</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>Identifizierung der Bindestelle von Phr am <i>aaa</i><sup>+</sup><i>atpase</i>-Promotor durch DNaseI-Footprinting .....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Analyse der Promotorsequenzen der durch Phr regulierten Gene .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Untersuchungen zur Phr-Regulation <i>in vivo</i> .....</b>	<b>50</b>
7.1	Analyse der mRNA-Menge von Phr und der AAA <sup>+</sup> ATPase bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen.....	50
7.2	Analyse der Proteinmenge von Phr bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ..	52
7.3	Phr-Bindung <i>in vivo</i> .....	53
7.3.1	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) .....	53
7.3.2	ChIP to chip-Analysen .....	57
<b>8.</b>	<b>Herstellung von Phr-Varianten zur Struktur- und Funktionsaufklärung .....</b>	<b>59</b>
8.1	Selenomethionin-Derivat von Phr .....	59
8.2	Verkürzte Variante von Phr (Phr <sub>AS 1-96</sub> ) .....	62

---

8.3	Phr mit einem C-terminalen His-Tag .....	64
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
1.	Die Funktion des archaeellen Regulators Phr und seiner Homologe bei der Hitzeschockantwort in Archaea .....	65
2.	Phr ist ein Transkriptionsregulator der winged Helix-Familie mit einer neuartigen C-terminalen Struktur .....	72
3.	Der molekulare Mechanismus der Phr-DNA-Erkennung ist einzigartig .....	76
4.	Vergleich der archaeellen Hitzeschockregulation durch Phr mit bekannten bakteriellen Repressorsystemen.....	80
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>VI</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>86</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>VIII</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>103</b>
1.	Abkürzungen .....	103
2.	Danksagung.....	106
3.	Erklärung.....	107

## I Einleitung

Alle Organismen müssen in der Lage sein, sich an ständig wechselnde Bedingungen in ihrer Umwelt anzupassen. Sobald die Umweltbedingungen für das Wachstum einer Zelle suboptimal werden, steht die Zelle unter Stress. Die häufigsten Stressauslöser sind Veränderungen im Nährstoffangebot, Veränderungen der Temperatur und der Salz- oder Sauerstoffkonzentration.

Die am besten untersuchte Stressreaktion ist die Antwort einer Zelle auf eine Temperaturerhöhung, die über die optimale Wachstumstemperatur hinausgeht. Es handelt sich um die sogenannte Hitzeschockantwort, die erstmals 1962 bei *Drosophila* (RITOSSA, 1962) entdeckt wurde und heute für alle Organismen nachgewiesen ist. Hitzestress führt in einer Zelle vor allem zu einer Schädigung der Proteine, die denaturiert werden und dadurch miteinander aggregieren. Hitzestress führt aber auch zu einer Reaktion der Zellen auf diesen Stress. Die Zellen verändern ihr Genexpressionsmuster und exprimieren Proteine, die es ihnen ermöglichen, unter den Stressbedingungen weiterzuwachsen oder zu überleben. Diese durch Stress induzierten Proteine werden als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet. Sie sorgen in der gestressten Zelle für die Reparatur und den Abbau beschädigter Proteine (PINTO et al., 1991; MARTIN et al., 1992). Ein großer Teil der HSP, die molekularen Chaperone, werden aber auch unter physiologischen, für die Zelle optimalen Bedingungen exprimiert. Die molekularen Chaperone sind für die Proteinfaltung sowie den Um- und Abbau von Proteinen unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell (GETHING und SAMBROOK, 1992; CRAIG et al., 1993; PARSELL und LINDQUIST, 1993).

Hitzeschockproteine werden gemäß ihrer Molekulargewichte in Familien eingeteilt, bestehend aus Hsp100, Hsp90, Hsp70 (Chaperone), Hsp60 (Chaperonine), Hsp40 (DnaJ), small Hsp (sHsp) und anderen, wie z.B. Proteasen (TRENT, 1994; GUPTA, 1995; MACARIO, 1995; RANSON et al., 1998).

Die Hitzeschockantwort ist ein über alle drei Domänen des Lebens hochkonservierter Prozess (MACARIO und CONWAY DE MACARIO, 2001 und 1999). So wurden die Gene *hsp40*, *hsp60* und *hsp70* ausnahmslos in allen bisher untersuchten bakteriellen und eukaryotischen Genomen gefunden. Eines der am höchsten konservierten und am intensivsten erforschten Chaperon-Systeme ist die Hsp70-Maschinerie. Sie umfasst die Komponenten Hsp70, Hsp40 und Hsp23, bei Bacteria DnaK, DnaJ und GrpE genannt. Die Proteine der Hsp70-

Maschinerie schützen neu entstehende Polypeptide während der Proteinsynthese und verhindern unter Stressbedingungen die Aggregation denaturierter Proteine. Trotz der hohen Konservierung der Komponenten des Hsp70-Systems und ihrem ubiquitären Vorkommen bei Bacteria und Eukaryoten findet man die Hsp70-Elemente nicht bei allen Archaeen. Bei einigen mesophilen und thermophilen Archaea, wie *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanosarcina barkeri*, *Thermoplasma acidophilum* oder *Halobacterium halobium* (SMITH et al., 1997) konnten die Hsp70-Gene identifiziert werden. Den Organismen *Methanococcus jannaschii* (BULT et al., 1996), *Archaeoglobus fulgidus*, der Gattung *Pyrococcus* und *Aeropyrum pernix* (KLENK et al., 1997; KAWARABAYASI et al., 1998 und 1999) fehlen sie dagegen. Das Fehlen der Hsp70-Maschinerie scheint charakteristisch für hyperthermophile Archaeen zu sein. Bei den Archaeen, die die Hsp70-Proteine besitzen, zeigen diese eine größere Ähnlichkeit zu ihren bakteriellen als zu den eukaryotischen Homologen und scheinen mit diesen enger verwandt zu sein (GRIBALDO et al., 1999). Die größten Ähnlichkeiten weisen die archaeellen Hsp70-Komponenten zu ihren Gegenstücken aus grampositiven Bakterien auf (MACARIO et al., 1999). Über die Funktion von archaeellem Hsp70, Hsp40 und GrpE ist wenig bekannt. Wegen der großen Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur zu den bakteriellen Homologen kann aber angenommen werden, dass beide Proteingruppen gleichartige Funktionen als molekulare Chaperone erfüllen. Bakteriell Hsp70 (DnaK) ist eine ATPase und bindet ATP und ungefaltete Proteine, wobei die Interaktion von DnaK mit dem Substratprotein durch ATP-Hydrolyse gefördert wird (MARTIN und HARTL, 1997). DnaJ dient als Cochaperon. Es bindet das Substratprotein und markiert es so für die Bindung durch DnaK. Gleichzeitig stimuliert DnaJ die ATPase-Aktivität von DnaK, wodurch die Affinität von DnaK für das Substrat gesteigert wird (LIBEREK et al., 1991; LAUFEN et al., 1999; KARZAI und McMACKEN, 1996). GrpE, der Nukleotid-Austauschfaktor, fördert die ADP-Freisetzung von DnaK und veranlasst DnaK dadurch, wieder ATP zu binden und das Substrat zu entlassen (LIBEREK et al., 1991; McCARTY et al., 1995; SZABO et al., 1994). Das freigesetzte Polypeptid gelangt daraufhin für die endgültige Faltung zum Chaperoninsystem (siehe unten). Zu der Hsp100-Familie der Eukaryoten bzw. der Clp-Familie der Bacteria gehören die größten bisher charakterisierten ATP-abhängigen Hitzeschockproteine. Diese Proteine sind in die Gruppe der Proteasen einzuordnen, die am Abbau von Proteinkomplexen sowie an der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt sind (PAK und WICKNER, 1997; PARSELL et al., 1994). Mit Ausnahme von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* findet man Hsp100

bzw. Clp-Homologe nicht bei Archaeen. Auch die Hitzeschockproteine der bei Eukarya und Bacteria vorkommenden Hsp90-Familie existieren nicht in Archaea.

Die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) umfasst verschiedene Chaperone mit Untereinheiten von 12 bis 43 kDa. Obwohl die sHsps in allen drei Domänen des Lebens verbreitet sind, sind sie dennoch die am wenigsten konservierten molekularen Chaperone. Gemeinsam haben sie eine konservierte C-terminale Sequenz, die homolog zu der Familie von  $\alpha$ -Kristallinen ist (DE JONG et al., 1998). Bei einem Hitzeschock sind es die sHsps, die von allen molekularen Chaperonen am stärksten induziert werden. sHsps bilden große oligomere Komplexe und verhindern ATP-unabhängig die Aggregation von denaturierten Proteinen (HASLBECK et al., 1999; JAKOB et al., 1999). In seltenen Fällen sind sHsps auch in der Lage, denaturierte Proteine rückzufalten (LAKSANALAMAI und ROBB, 2004).

Das Prefoldin (oder GimC) ist ein weiteres ATP-unabhängiges Chaperon. Es existiert in allen Eukaryoten und Archaeen (GEISSLER et al., 1998; VAINBERG et al., 1998). In Eukaryoten bindet das Prefoldin ungefaltetes Aktin und Tubulin und leitet diese an das Chaperoninsystem der Gruppe II (siehe unten) zur korrekten Faltung weiter (HANSEN et al., 1999; VAINBERG et al., 1998). Archaeelle Prefoldine wurden näher in *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (LEROUX et al., 1999; LUNDIN et al., 2004) und in *Pyrococcus horikoshii* (OKOCHI et al., 2002 und 2004) untersucht und funktionell als molekulare Chaperone charakterisiert. Sie sind in der Lage, mit ihren tentakelartigen Fortsätzen ungefaltete Proteine zu binden und sie anschließend der chaperoninabhängigen Faltung zu übergeben.

Neben den Chaperonen sind die Chaperonine entscheidend für die universelle Hitzeschockantwort. Während die Chaperone die entstehenden Polypeptide oder die denaturierten Proteine in einem vor Abbau und Aggregation geschützten Zustand gebunden halten, sind die Chaperonine (Hsp60-Familie) für die aktive Proteinfaltung zuständig (HEMMINGSEN et al., 1988). Chaperonine sind ebenfalls hoch konserviert und ubiquitär in allen untersuchten Lebewesen mit Ausnahme einiger *Mycoplasma*-Spezies (GLASS et al., 2000) vorhanden. Diese ca. 60 kDa Proteine bilden große multimere Ringe, die tunnelähnliche Strukturen formen, in deren Inneren die Polypeptide in einem ATP-abhängigen Reaktionsmechanismus gefaltet werden. Man unterscheidet zwei Klassen von Chaperoninen, die Chaperonine der Gruppe I und die der Gruppe II (HORWICH und WILLISON, 1993). Chaperonine der Gruppe I kommen in Bakterien (z.B. GroEL in *E. coli*), in Mitochondrien (mtHsp60), in Chloroplasten (Rubisco-Untereinheit bindendes Protein) und als Ausnahme in Archaeen der Gattung *Methanosarcina* vor (KLUNKER et al., 2003;



FIGUEIREDO et al., 2004). Sie arbeiten funktionell mit Cofaktoren der Hsp10-Familie (GroES) zusammen, die heptamere Ringe aus 10 kDa-Untereinheiten bilden und den GroEL- bzw. Hsp60-Tunnel an einem Ende deckelartig verschließen (ELLIS und HARTL, 1996). Chaperonine der Gruppe II sind die eukaryotenähnlichen Chaperonine. Sie werden im eukaryotischen Cytosol und in Archaeen gefunden (TRENT et al., 1991; GAO et al., 1992). Die Chaperonine des eukaryotischen Cytosols bilden heteropolymere Ringe aus acht verschiedenen Untereinheiten (KUBOTA et al., 1994 und 1995). Sie sind Cofaktor-unabhängig, arbeiten aber mit anderen Chaperonen, den Prefoldinen (oder GimC, siehe oben), zusammen (VAINBERG et al., 1998; LEROUX et al., 1999). Die archaeellen Typ II-Chaperonine werden auch als Thermosomen bezeichnet (WALDMANN et al., 1995; ARCHIBALD et al., 1999). Sie bestehen aus ein bis drei unterschiedlichen Typen von Untereinheiten, die sich zu homo- oder heteropolymeren Ringen zusammenlagern und zylindrische Komplexe formen (PHIPPS et al., 1991).

Neben den klassischen Chaperonen und Chaperoninen werden auch verschiedene andere Proteine bei einem Hitzeschock vermehrt exprimiert. Dazu gehören Vertreter der AAA<sup>+</sup>-Familie der AAA ATPasen (ATPases associated with a variety of cellular activities; KUNAU et al., 1993; NEUWALD et al., 1999; OGURA und WILKINSON, 2001). AAA<sup>+</sup>ATPasen konnten in allen bisher untersuchten Organismen nachgewiesen werden, wo sie viele unterschiedliche Funktionen erfüllen. Diese ringförmigen oligomeren Komplexe sind unter anderem an der energieabhängigen Proteolyse sowie an der Proteinfaltung beteiligt. Die hitzeinduzierten AAA<sup>+</sup>-Proteine der Archaea sind am stärksten homolog zu dem menschlichen NSF (= N-Ethylmaleimid Sensitives Fusions) -Protein und den Cdc48- (= cell division control) Proteinen aus Hefe (LAKSANALAMAI et al., 2004). Die eukaryotische ATPase NSF ist nicht hitzereguliert, sie ist an Membrantransportprozessen beteiligt. Cdc48-Proteine sind essentielle molekulare Chaperone, die entscheidend für die korrekte Zellteilung in Eukaryoten sind und die Auflösung des Spindelapparates nach der Mitose regulieren (CAO et al., 2003). Die genaue Funktion der archaeellen AAA<sup>+</sup>ATPasen nach einer Induktion durch Hitzeschock ist noch nicht geklärt. Es wird aber angenommen, dass sie funktionell die Aufgaben der großen Hsps der Eukaryoten und Bakterien, die den meisten Archaeen fehlen, übernehmen könnten (LAKSANALAMAI et al., 2004) und ATP-abhängig den Proteinabbau und die Proteinfaltung unterstützen. Kürzlich wurde die Funktion einer AAA<sup>+</sup>ATPase von *Thermoplasma in vitro* analysiert, wobei eine Proteinentfaltungsaktivität der ATPase nachgewiesen werden konnte (GEREGA et al., 2005).

Bei einem Hitzeschock sammeln sich trotz der Aktivität der molekularen Chaperone verstärkt denaturierte Proteine und Polypeptide in der Zelle an. Der Abbau der zerstörten und aggregierten Proteine erfolgt bei allen Organismen durch verschiedene ATP-abhängige und -unabhängige Proteasen. Dabei sind die Proteasen aber nicht nur unter Stressbedingungen von Bedeutung, sondern auch essentiell für den kontrollierten Abbau falsch synthetisierter oder überflüssiger Proteine unter Normalbedingungen. Zu den Proteasen gehören einfache monomere Hydrolasen sowie große multimere Komplexe. Multimere Proteasekomplexe sind die bereits erwähnten Hsp100 bzw. Clp-Proteine der Eukaryoten und Bakterien. Auch das in allen drei Domänen des Lebens vorkommende Proteasom (VOLKER und LUPAS, 2002) ist ein Multienzymkomplex. Bei diesen großen ATP-abhängigen Proteasen finden sich Domänen der AAA<sup>+</sup>-Proteine wieder, die mit ihrer ATPase-Aktivität den Abbau der Proteine katalysieren (MAUPIN-FURLOW et al., 2004).

Während mesophile Organismen schon bei Temperaturen um 45°C eine Hitzeschockantwort zeigen, sind andere Organismen strikt auf Hitze angewiesen. Die Gruppe der Hyperthermophilen braucht Temperaturen von über 80°C für ein optimales Wachstum (STETTER, 1990). Alle Hyperthermophilen sind Prokaryoten, die meisten gehören zu der Domäne der Archaea (STETTER, 1990). Im phylogenetischen Stammbaum, basierend auf 16S rRNA-Analysen, gruppieren sich die hyperthermophilen Organismen nahe der Wurzel. Da die Hyperthermophilen optimal bei Temperaturen leben, die für andere Organismen tödlich sind, müssen sie speziell an diese Gegebenheiten angepasst sein. Ein einheitliches Prinzip zum Schutz der Makromoleküle der Zelle vor Degradation durch die hohen Temperaturen gibt es aber nicht. Es werden viele verschiedene Strategien zur Stabilisierung der Makromoleküle verfolgt. Die DNA droht bei hohen Temperaturen zu denaturieren. Da DNA *in vitro* durch Zugabe von Salzen stabilisiert werden kann und in einigen hyperthermophilen Organismen, so auch in *Pyrococcus furiosus*, sehr hohe Konzentrationen an Kaliumdiinositolphosphat (SCHOLZ et al., 1992) oder zyklischem 2,3-Diphosphoglycerat (HENSEL und KÖNIG, 1988) vorliegen, wird vermutet, dass diese Salze die Nukleinsäuren und auch die Proteine *in vivo* stabilisieren. Ein Charakteristikum aller hyperthermophilen Archaea ist der Besitz einer Reversen Gyrase, die die DNA positiv überspiralisiert (KIKUCHI und ASAI, 1984; BOUTHIER DE LA TOUR et al., 1990). Es wird vermutet, dass die positive Überspiralisierung zur Stabilität der DNA beiträgt (LOPEZ-GARCIA, 1996). Auch die archaeellen Histone haben wahrscheinlich bei hohen Temperaturen eine stark stabilisierende Wirkung auf die DNA (HIGASHIBATA et al., 2003).

Die Stabilisierung der RNA erfolgt vermutlich durch posttranskriptionale Modifikationen. tRNAs hyperthermophiler Archaea werden auffällig häufig und mit steigenden Wachstumstemperaturen stärker posttranskriptional modifiziert (EDMONDS et al., 1991). Archaeelle Zellmembranen erlangen durch ihre Etherbindungen zwischen den Glycerinen und ihren hydrophoben Seitenketten im Vergleich zu den Esterbindungen in bakteriellen und eukaryotischen Membranen eine erhöhte Stabilität (KATES, 1993). Außerdem besitzen hyperthermophile Archaea eine stark hitzeresistente Monolayer-Membran anstelle des Bilayers bei Bacteria und Eukarya. Generell sind die Membranlipide hyperthermophiler Organismen sehr reich an gesättigten Fettsäuren, was die Funktionsfähigkeit und Stabilität der Membranen bei hohen Temperaturen garantiert.

Besonders entscheidend für das Überleben bei Hitze ist aber auch die Proteinstabilität. Um diese zu gewährleisten, gibt es allerdings keine generellen Mechanismen. Die Stabilität eines Proteins wird vielmehr durch das Zusammenwirken vieler schwacher, nicht kovalenter Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionischer Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophober Wechselwirkungen erreicht. Einzelne Punktmutationen, die keine Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur eines Proteins haben, können drastische Auswirkungen auf die Proteinstabilität haben (GRUTTER et al., 1989). Das zeigt, dass nur einige wenige Interaktionen notwendig sind, um die große Stabilität von hyperthermophilen Proteinen sicherzustellen. Vergleichende Analysen der Proteinsequenzen von mesophilen und hyperthermophilen Proteinen konnten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung aufzeigen. So enthalten Proteine aus hyperthermophilen Organismen eine größere Anzahl an geladenen Aminosäuren und eine geringere Anzahl an polaren, ungeladenen Aminosäuren als Proteine aus mesophilen Organismen. Durch die erhöhte Anzahl an geladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche kommt es vermehrt zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, was zur Thermostabilität der Proteine beiträgt (SCANDURRA et al., 1998 und 2000). Vor allem die sogenannten Ionennetzwerke, die durch eine Anhäufung ionischer Wechselwirkungen auf der Proteinoberfläche zustande kommen, fördern die Thermostabilität von Proteinen (YIP et al., 1995; HENNIG et al., 1995). Des Weiteren begünstigen verschiedene andere Eigenschaften hyperthermophiler Proteine die Thermostabilität, beispielsweise eine erhöhte Hydrophobizität, eine erhöhte Packungsdichte, die Reduzierung von Proteinschleifen und die verstärkte Zusammenlagerung von Proteinuntereinheiten zu oligomeren Komplexen (zusammengefasst bei STERNER und LIEBL, 2001).

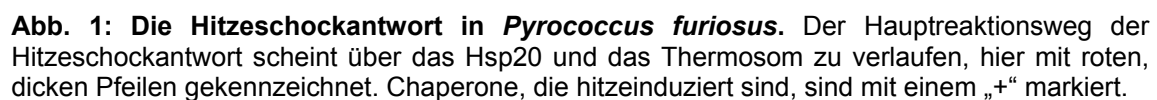
Proteine hyperthermophiler Organismen sind also an die Wachstumsbedingungen der Organismen angepasst und arbeiten bei hohen Temperaturen entsprechend stabil und optimal.

Bei einer Temperaturerhöhung über das Optimum hinaus beginnen aber auch die hyperthermophilen Proteine zu denaturieren und der Organismus reagiert - wie alle anderen auch - mit einer Hitzeschockantwort.

*Pyrococcus furiosus* ist ein hyperthermophiler, strikt anaerober Organismus, der dem Reich der Euryarchaeota und der Ordnung der Thermococcales angehört (ZILLIG et al., 1987). Erstmals wurde *Pyrococcus furiosus* 1986 von FIALA und STETTER aus geothermal erhitzten Sedimenten vor der Insel Vulcano in Italien isoliert. *P. furiosus* lebt heterotroph und fermentiert Peptide, Aminosäuren und Zucker. Fakultativ reduziert er Schwefel zu Schwefelwasserstoff. *P. furiosus* wächst optimal bei etwa 100°C.

Wie allen hyperthermophilen Archaeen fehlt *Pyrococcus* die sonst so weit verbreitete Hsp70-Chaperon-Maschinerie (siehe oben) (MACARIO und CONWAY DE MACARIO, 1999). Das zentrale Hitzeschockprotein von *Pyrococcus furiosus* scheint das archaeelle Chaperonin, das Thermosom, zu sein. Es katalysiert die energieabhängige Proteinfaltung und wird unter Hitzeschockbedingungen stark induziert (SHOCKLEY et al., 2003).

Weiterhin findet man bei *P. furiosus* ein kleines Hitzeschockprotein, das Hsp20 oder Pfu-sHsp. Während andere Archaeen zwei oder drei Kopien des sHsp haben (LAKSANALAMAI und ROBB, 2004), besitzt *P. furiosus* nur eine Kopie dieses Proteins. Das Hsp20 verhindert genau wie das auch bei *P. furiosus* vorkommende Prefoldin die Aggregation denaturierter Proteine. Die entfalteten Proteine werden durch Bindung an das Hsp20 oder das Prefoldin stabilisiert und für die anschließende Rückfaltung dem Chaperoninsystem übergeben. *Pyrococcus* Hsp20 und Prefoldin wurden bereits in verschiedenen Studien näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Pfu-sHsp in der Lage ist, viele *E. coli*-Proteine *in vitro* vor der Aggregation durch Hitze zu schützen. Außerdem steigert Pfu-sHsp die Überlebensfähigkeit von *E. coli*-Zellen bei hohen Temperaturen (LAKSANALAMAI et al., 2001). Eine Proteinfaltungsaktivität konnte für Pfu-sHsp nicht nachgewiesen werden. Während das Pfu-sHsp unter normalen Wachstumsbedingungen kaum exprimiert wird, ist die Genexpression unter Hitzeschockbedingungen deutlich gesteigert (SHOCKLEY et al., 2003). *Pyrococcus* Prefoldin, welches ein Hexamer aus zwei  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Untereinheiten ist (OKOCHI et al., 2002), wird auch unter Nicht-Hitzeschockbedingungen synthetisiert. Eine Hitzebehandlung der Zellen führt zu keiner verstärkten Expression des Prefoldins. Das Gen für die  $\beta$ -Untereinheit wird bei Temperaturerhöhung im Gegenteil sogar herunterreguliert (SHOCKLEY et al., 2003). *In vitro* wurde gezeigt, dass *Pyrococcus* Prefoldin die hitzebedingte Aggregation von Proteinen verhindern kann (OKOCHI et al., 2002).



Es wurde beobachtet, dass hyperthermophile Archaeen gelöste organische Stoffe akkumulieren, die nicht oder nur in geringem Maße bei mesophilen Organismen gefunden werden (MARTINS et al., 1997). Diese Stoffe stabilisieren wahrscheinlich Proteine oder andere Makromoleküle bei Hitze. Bei *Pyrococcus* wurden hohe Konzentrationen (500-900 mM) an Dimyoinositolphosphat (DIP) festgestellt (SCHOLZ et al., 1992), die bei einer Temperaturerhöhung von 95°C auf 101°C auf circa das 20fache ansteigen (MARTINS und SANTOS, 1995). DIP ist daher vermutlich auch als eine Komponente der Hitzeschockantwort von *P. furiosus* anzusehen. Eine Übersicht der bei *Pyrococcus furiosus* vorkommenden Hitzeschockproteine und der Hauptwege der Hitzeschockantwort liefert Abbildung 1.

Insgesamt scheint die Hitzeschockantwort bei *Pyrococcus furiosus* weniger komplex zu sein und weniger Gene zu beinhalten, als die der meisten nicht thermophilen Archaeen. Das vereinfachte Hitzeschocksystem mag mit der allgemein geringeren Genomgröße hyperthermophiler Archaeen zusammenhängen (1,91 Mb bei *P. furiosus*). Die Chaperone der hyperthermophilen Archaeen sind zum größten Teil homolog zu den eukaryotischen Chaperonen. Bei den mesophilen Archaeen ist die Hitzeschockantwort durch das zusätzliche Vorkommen von Chaperonen, die Ähnlichkeiten zu den Chaperonen der Bacteria aufweisen, komplexer. Es wird diskutiert, dass die Chaperone der Mesophilen, die denen von Bakterien ähneln, möglicherweise durch lateralen Gentransfer von den Bacteria erworben wurden (KLUNKER et al., 2003; GALAGAN et al., 2002).

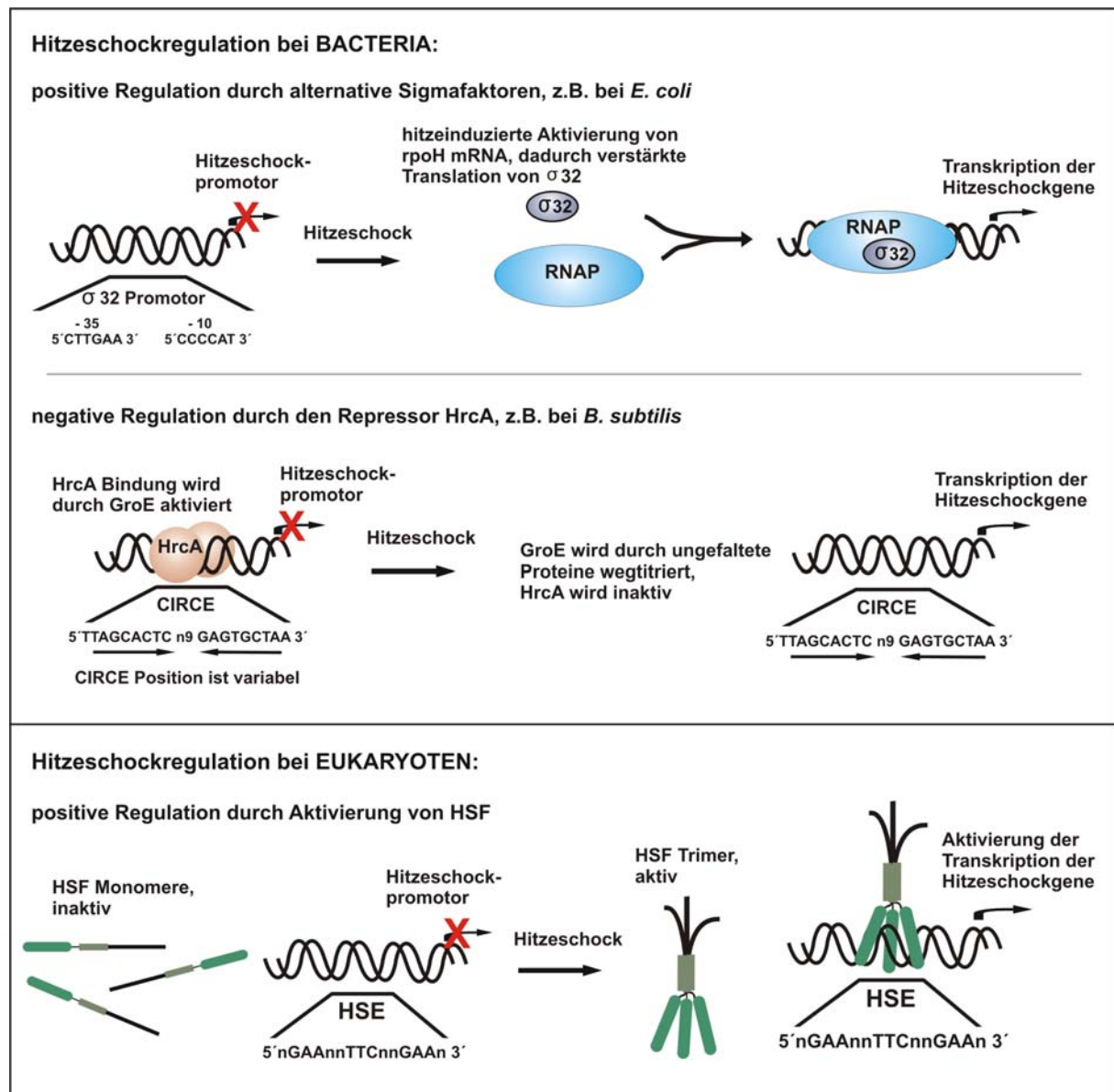
Im Gegensatz zu den Archaea ist die Hitzeschockantwort der Bakterien und Eukaryoten bereits sehr intensiv erforscht, und auch über die Regulation dieser Systeme ist schon viel bekannt. Die Expression der hoch konservierten Hitzeschockgene wird auf sehr unterschiedliche Weise kontrolliert.

Bei Bacteria spielen alternative Sigmafaktoren eine entscheidende Rolle. Sie wirken als Transkriptionsaktivatoren, indem sie spezifisch an Hitzeschockpromotoren binden. In *E. coli* werden die Haupthitzeschockgene zum Beispiel durch  $\sigma^{32}$  reguliert, andere Hitzeschockgene durch  $\sigma^E$ . In grampositiven Bakterien ist der Faktor  $\sigma^B$  für die Erkennung der Hitzeschockpromotoren zuständig. Die molekularen Chaperone selbst haben meist auch eine regulatorische Funktion. Bei *E. coli* sind DnaK und DnaJ am Abbau von  $\sigma^{32}$  beteiligt, indem sie den Sigmafaktor unter physiologischen Bedingungen binden und dessen proteolytische Hydrolyse fördern (BUKAU, 1993). Treten in Folge eines Hitzeschocks vermehrt denaturierte Proteine auf, werden diese von der DnaK-Chaperon-Maschinerie gebunden,  $\sigma^{32}$  wird aus dem DnaK-Komplex freigesetzt und vermittelt die Transkription der Hitzeschockgene. Außerdem

bewirkt eine Temperaturerhöhung die verstärkte Translation von  $\sigma^{32}$  durch Auflösung einer Sekundärstruktur der mRNA am Translationsstart.

Auch die negative Kontrolle der Hitzeschockgene durch Repressoren ist bei den Bacteria weit verbreitet. Bei den grampositiven Bakterien, den Proteobakterien und den Cyanobakterien ist der häufigste Repressor HrcA (heat regulation at CIRCE), der an ein konserviertes Sequenzelement (CIRCE = controlling inverted repet of chaperone expression; ZUBER und SCHUMANN, 1994) stromaufwärts von Hitzeschockgenen bindet. HrcA bindet CIRCE unter stressfreien Bedingungen in seiner aktiven Form, die durch Komponenten der GroE-Chaperon-Machinerie aufrechterhalten wird. Bei einem Hitzeschock werden die GroE-Chaperonine durch denaturierte Proteine wegtitriert, HrcA wird inaktiv und gibt so die Transkription der Hitzeschockgene frei (MOGK et al., 1997). Neben dem CIRCE/HrcA-System findet man bei den Bacteria verschiedene andere negative Kontrollmechanismen der Hitzeschockantwort, die oft mit positiven Kontrollmechanismen zu einem komplizierten regulatorischen Netzwerk verflochten sind.

In Eukaryoten wird die Hitzeschockantwort positiv durch Hitzeschockfaktoren (HSF) reguliert, die durch Bindung an hochkonservierte, cis-wirkende Sequenzelemente (Hitzeschock-Elemente oder HSE) die Transkription der Hitzeschockgene aktivieren (WU et al., 1987). Das HSE setzt sich aus mehreren benachbarten und inversen Wiederholungen der Pentanukleotidsequenz 5'-nGAAn-3' zusammen (FERNANDES et al., 1994). Die eukaryotische HSF-HSE-Interaktion ist von den Hefen bis zu den Menschen konserviert (WU, 1995; MORIMOTO, 1998). In ungestressten Zellen liegen die HSF in der Regel als Monomere in einem inaktiven Zustand vor. Bei einem Hitzeschock bildet sich durch Trimerisierung die aktive Form der HSF, die mit dem HSE interagiert (PERISIC et al., 1989; WESTWOOD et al., 1991). Aufgrund der Komplexität der Eukaryoten gibt es natürlich Variationen dieses vereinfachten Modells. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bindet der HSF auch unter normalen Wachstumsbedingungen an das HSE und wird durch eine hitzeinduzierte Phosphorylierung aktiviert (SORGER und PELHAM, 1988). Die Hitzeschockantwort höherer Eukaryoten wird kompliziert durch das Auftreten mehrerer unterschiedlicher HSF (SARGE et al., 1991; MORIMOTO, 1998). Hierdurch wird eine differenziertere Kontrolle der Hitzeschockgenexpression und damit eine komplexe Antwort auf verschiedene Stresssignale ermöglicht.



**Abb. 2: Regulation der Hitzeschockantwort in Bacteria und Eukaryoten.** Vereinfachte schematische Darstellung der wichtigsten Regulationsmechanismen. Die *rpoH* mRNA codiert für  $\sigma^{32}$ .

Über die Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort ist weitaus weniger bekannt als über die der bakteriellen und eukaryotischen Systeme.

Die Regulation der Hitzeschockantwort findet hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt. Die archaeelle Transkriptionsmaschinerie weist große Ähnlichkeiten zu dem RNA-Polymerase II-System der Eukaryoten auf, wobei das archaeelle System als eine vereinfachte Version des eukaryotischen angesehen werden kann (THOMM, 1996; BELL und JACKSON, 1998). Der Transkriptionsapparat der Archaea besteht aus einer eukaryotenähnlichen RNA-Polymerase (RNAP) sowie den zwei eukaryotenähnlichen Initiationsfaktoren TBP und TFB (FREY et al., 1990; HAUSNER und THOMM, 1993; THOMM et al., 1994; GOHL et al.,



1995). TBP erkennt und bindet die archaeelle TATA-Box 25 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Diese Bindung wird durch Anlagerung von TFB an das TFB-Erkennungselement (= BRE, transcription factor B recognition element) direkt stromaufwärts der TATA-Box stabilisiert und der Präinitiationskomplex mit der Anlagerung der RNAP vervollständigt. Im Gegensatz zu dem eukaryotischen System, bei dem weitere Faktoren wie TFIIF und TFIIE an der Transkriptionsinitiation beteiligt sind, existieren bei den Archaea neben TBP und TFB keine weiteren Initiationsfaktoren. Es findet sich allerdings ein archaeelles Protein, das Sequenzhomologien zu der N-terminalen Region der  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen TFIIE besitzt. Dieses archaeelle TFE ist für die *in vitro*-Transkription nicht essentiell, kann sie allerdings an einigen Promotoren verstärken (BELL et al., 2001; HANZELKA et al., 2001). Auch ein Homolog des eukaryotischen Elongationsfaktors TFIIIS kommt in Archaeen vor (LANGER und ZILLIG, 1993; HAUSNER et al., 2000).

Trotz der großen Ähnlichkeiten des archaeellen Transkriptionsapparates mit der basalen Transkriptionsmaschinerie der Eukaryoten bestehen deutliche Unterschiede in der Regulation dieser beiden Systeme. Die meisten der bisher in Archaea identifizierten Transkriptionsregulatoren sind homolog zu bakteriellen Proteinen (KYRPIDES und OUZOUNIS, 1999). Daneben existieren aber auch einige archaeenspezifische Regulatoren. Ein großer Teil der archaeellen Regulatoren sind Repressoren mit einem Helix-Turn-Helix (HTH)-DNA-Bindemotiv, wobei die Sequenzen der archaeellen HTH-Bindemotive eine größere Ähnlichkeit zu bakteriellen als zu eukaryotischen HTH-Domänen aufweisen (ARAVIND et al., 1999). Inzwischen wurden einige archaeelle Regulatoren näher charakterisiert. Viele erinnern in ihrer Wirkungsweise an bakterielle Regulatorproteine, indem sie im Promotorbereich eine bestimmte Sequenz binden und damit direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat in Wechselwirkung treten. Dabei verhindern sie zum Beispiel die Promotorbindung von TBP und TFB (BELL und JACKSON, 2000; NAPOLI et al., 1999) oder die Anlagerung der RNAP an den TBP/TFB-Promotorkomplex (BELL et al., 1999; BRINKMANN et al., 2000; DAHLKE und THOMM, 2002; VIERKE et al., 2003).

Bisher wurde ein einziger archaeeller Regulator, der sehr entfernte Homologien zu einem eukaryotischen Genregulator aufweist, beschrieben. Es handelt sich um das Protein GvpE, einen Transkriptionsaktivator mit einem eukaryotentypischen Leucin-Zipper-Motiv (KRÜGER et al., 1998). GvpE aktiviert in halophilen Archaea die Gasvesikelsynthese, indem es vermutlich mit der basalen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung tritt (HOFACKER et al., 2004).

Es stellt sich nun die Frage, wie die Hitzeschockantwort in Archaeen reguliert wird.

Es ist offensichtlich, dass sich die archaeellen Regulationsmechanismen grundlegend von den oben beschriebenen bakteriellen und eukaryotischen Mechanismen unterscheiden müssen. Zum einen besitzen die Archaeen keine Sigmafaktoren wie die Bacteria, zum anderen findet man auch keine eukaryotenähnlichen HSF oder HSE bei Archaea. Das lässt vermuten, dass bei den Archaeen ein ganz eigener Mechanismus der kontrollierten Expression der Hitzeschockgene existiert. Viele Studien beschäftigen sich mit der archaeellen Hitzeschockantwort. Es wurden bereits zahlreiche archaeelle Hitzeschockgene und -proteine identifiziert und charakterisiert. Außerdem wurde für viele Gene nachgewiesen, dass sie bei einem Hitzeschock verstärkt exprimiert werden. Wie allerdings die erhöhte Expression zustande kommt, konnte bisher nicht geklärt werden.

Im Zuge vergleichender bioinformatischer Analysen archaeeller Genomsequenzen haben GELFAND et al. 2000 ein konserviertes potentiell Hitzeschockoperon und einen potentiellen Hitzeschockregulator in Euryarchaeoten vorgeschlagen. Dieses potentielle Operon besteht aus den Hitzeschockgenen *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20*. Bei *Archaeoglobus fulgidus* liegen diese Gene direkt hintereinander. In *Pyrococcus* sind sie durch eine 165 Basenpaare lange Sequenz voneinander getrennt. Bei *Methanothermobacter thermoautotrophicus* sind die beiden Gene ebenfalls vorhanden, sie befinden sich aber im Genom nicht in unmittelbarer Nachbarschaft. Die Sequenz des potentiellen Regulatorproteins liegt bei *A. fulgidus* direkt vor den Genen *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20*. In den anderen genannten Genomen liegt das Regulatorgen nicht in räumlicher Nähe der Hitzeschockgene.

Der potentielle Hitzeschockregulator aus *Pyrococcus furiosus* wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit kloniert und gereinigt (VIERKE, 2001). In ersten Versuchen konnte eine hemmende Wirkung dieses Proteins auf die *in vitro*-Transkription der Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* festgestellt werden (VIERKE, 2001). Der Regulator bekam die Bezeichnung Phr für *Pyrococcus* heat shock regulator.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der eingehenderen Charakterisierung von Phr. Phr wird durch *in vitro*- und *in vivo*-Studien in seiner Funktion als neuartiger archaeeller Hitzeschockregulator beschrieben. Die dreidimensionale Struktur dieses Proteins wurde aufgeklärt. Außerdem wurde die sogenannte ChIP to chip-Methode angewendet, die es ermöglicht, genomweit nach Zielgenen von Phr zu forschen.

Es wird ein Mechanismus zur Kontrolle der Expression von Hitzeschockgenen in Archaea durch den Regulator Phr vorgestellt.

## II Material und Methoden

### 1. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm JM109	(Yanisch-Peron et al., 1985)
<i>Escherichia coli</i> , Stamm BL21-CP(DE3)-RIL	(Epicurian, Stratagene, La Jolla, USA)
<i>Pyrococcus furiosus</i> , Stamm VC1	(Fiala und Stetter, 1986)

### 2. Plasmide

upatpase	VIERKE et. al, 2003
uphsp20	VIERKE et. al, 2003
upphr	VIERKE et. al, 2003
pUC19/gdh	HETHKE et. al, 1996
pUC19	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
pET-30a(+)	Novagen, Madison, USA

### 3. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien

#### 3.1 Enzyme und andere Proteine

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qbiogene, Carlsbad (USA)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Madison (USA)
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla (USA)
T4 Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
T4 Ligase	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs (USA)
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison (USA)
DNaseI	Roche, Mannheim
ProteinaseK	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)

<i>Micrococcus</i> Nuklease	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
RNaseA	Roche, Mannheim
BSA	Roche, Mannheim

Restriktionsendonukleasen:

<i>NdeI</i>	New England Biolabs (USA)
<i>BamHI</i>	New England Biolabs (USA)
<i>XhoI</i>	New England Biolabs (USA)
<i>SmaI</i>	New England Biolabs (USA)

RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren:

Die RNA-Polymerase, TBP und TFB von *Pyrococcus furiosus* lagen bereits gereinigt im Labor vor (HETHKE et al., 1996).

### 3.2 Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Brillant Blue G 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cy3-dUTP	GE Healthcare, Freiburg
Cy5-dUTP	GE Healthcare, Freiburg
dNTP-Mix	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
DTT	Biomol, Ilvesheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt

Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Merck, Darmstadt
Imidazol	Sigma, St. Louis (USA)
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isotope ([ $\alpha^{32}\text{P}$ ]- UTP, [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Kanamycin	Sigma, St. Louis (USA)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
NTP-Mix	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg oder Qiagen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham, Freiburg
Proteinstandard	Serva, Heidelberg
Röntgenfilme	
KODAK BioMax MR	Kodak, Rochester (Großbritannien)
FUJI NIF RX	Fuji, Tokio (Japan)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Selenomethionin	Sigma, St. Louis (USA)
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, St. Louis (USA)
ThermoPol Reaction Buffer	New England Biolabs (USA)
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Whatman-Papier	3MM, Maidstone (Großbritannien)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war in der Regel p.a..

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

#### 4. Oligonukleotide

ATPF2	5'- GGT TCT ATT ATC AAT TAA TTC C - 3'
ATPR1	5'- CTC AAC AAC ATC TCC TGG TG - 3'
20R1	5'- CTT GGC CTG CTG AAG AAT TC - 3'
PfPr1F1	5'- GCT GGA GTT ACC GTT GTT C - 3'
PfPr1R	5'- GCT CGC TGA CAA AGT AAG G - 3'
M13/pUCr	5'- GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A - 3'
M13/pUCf	5'- GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG - 3'
atp_new-F	5'- TTC AAA ATC CTT GGA TCA TAA CC - 3'
atp_new-R	5'- TGC CCC TAC CAA CAT CTC TC - 3'
hsp20new-F	5'- TGG AGT ATT TTT GAT TGT TCG GTA - 3'
hsp20new-R	5'- TTC CCT TAT TAG GTC GAA TGG A - 3'
phr_new-F	5'- TTG TGG GAA TTG GTG GAT CT - 3'
phr_new-R	5'- TCC TTG TTT CAT TCC CCA ATA - 3'
gdh_new-F	5'- TTG AAA ATG TTT GAG GAA CAC C - 3'
gdh_new-R	5'- TTG GGC AGC TCT TTC AAG TT - 3'
Pftrpexp1-F	5'- GGA ATT CCA TAT GGG AGA GGA GCT AAA CAG - 3'
PftrpexpR-4	5'- CGC GGA TCC TAG TAC ATC TCT GAA CCA AAT AGG - 3'
Phr_C-his_r	5'- GCC GCT CGA GAA TGT TAA TGT TTA GGA ATT - 3'
wt35bp	5'- TAA GAG TTT TAG TAA CCA TTG TAA TCA AAA TAT TG - 3'
Linker1	5'- GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C - 3'
Linker2	5'- GAA TTC AGA TC - 3'

## 5. Kultivierung von *Pyrococcus furiosus*

*Pyrococcus furiosus*-Zellen wurden im Fermenter (100 oder 45 Liter) in synthetischem Meerwassermedium bei 95°C angezogen (FIALA und STETTER, 1986). Zur Untersuchung der Transkriptionsaktivitäten der Hitzeschockgene wurde die Temperatur im Fermenter während der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen ( $OD_{578}$  von 0.5) von 95°C auf 103°C erhöht. Von der Kultur wurden jeweils vor Temperaturerhöhung sowie 30, 60 und 90 min nach Erreichen der Temperatur von 103°C Aliquots von je 2 Litern entnommen. Die Aliquots wurden bei der Entnahme sofort über eine Kühlschleife auf 4°C abgekühlt. Die Zellernte erfolgte durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm. Die Zellsedimente wurden in TBS (300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.6) resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

*Pyrococcus furiosus*-Zellen wurden auch während unterschiedlicher Wachstumsphasen geerntet. Dazu wurden aus einer bei 95°C wachsenden Kultur bei einer  $OD_{578}$  von 0.14 (frühe exponentielle Phase), 0.27 (späte exponentielle Phase), 0.6 (frühe stationäre Phase) und 0.58 (späte stationäre Phase) Aliquots von jeweils 6.2, 4.5, 3.0 bzw. 2.0 Litern entnommen und wie oben beschrieben geerntet.

*Pyrococcus furiosus* Zellen, die für *in vivo*-Studien mit Formaldehyd fixiert wurden, wurden in einem 40 Liter Fermenter angezogen. Das weitere Vorgehen mit diesen Kulturen wird in dem Abschnitt „Formaldehydfixierung und Immunpräzipitation“ (siehe 12.1) beschrieben.

## 6. Konstruktion des Plasmids *upphr*

Der Promotorbereich des *Pyrococcus furiosus* Gens *phr* wurde aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert. Es wurden die Primer PfPr1F1 und PfPr1R verwendet. Nach Reinigung der PCR-Produkte (QIAquick PCR-Purification Kit, Qiagen) wurden diese in das zuvor mit dem Enzym *Sma*I hydrolysierte Plasmid pUC19 ligiert. Die korrekte Sequenz wurde durch eine Sequenzierung (SANGER et al., 1977) überprüft. Das Plasmid *upphr* wurde vor dem Einsatz als Matrize für die *in vitro*-Transkriptionsversuche durch eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (SAMBROCK et al. 1989) aufgereinigt.

## 7. *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkriptionsversuche wurden im zellfreien Transkriptionssystem für *Pyrococcus furiosus* (HETHKE et al., 1996) mit rekombinanten Transkriptionsfaktoren und aufgereinigter DNA-abhängiger RNAP aus *Pyrococcus furiosus* durchgeführt. Als Matrizen-DNA dienten jeweils 300 ng linearisiertes Plasmid (Plasmide siehe Abschnitt 2). Des Weiteren bestand ein Transkriptionsansatz aus 0.012  $\mu\text{M}$  *Pyrococcus*-RNA-Polymerase, 0.076  $\mu\text{M}$  TFB, 0.68  $\mu\text{M}$  TBP und unterschiedlichen Mengen (0.37-1.5  $\mu\text{M}$ ) Phr in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$ . Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler für 30 min bei 70°C inkubiert und die Transkripte anschließend auf einem 8%igen Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die Auswertung der Experimente erfolgte durch Autoradiographie.

## 8. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

### 8.1 EMSA mit radioaktiv markierter DNA

Die DNA-Matrize mit der Promotorregion des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens wurde in einer PCR-Reaktion mit dem Plasmid *upatpase* als Matrize hergestellt. Hierfür wurde der unmarkierte Primer M13/pUCr und der durch die T4-Polynukleotidkinase mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP markierte Primer ATPF2 verwendet. Die PCR-Ansätze wurden zur Reinigung auf einem 6%igen, nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, aus diesem ausgeschnitten und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA) eluiert. Nach einer Ethanolfällung wurden etwa 1-10 ng der DNA pro Reaktion eingesetzt. Ein 10  $\mu\text{l}$ -Versuchsansatz bestand aus 40 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 325 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 5% Polyethylenglycol (PEG) 8000, 3  $\mu\text{g}$  BSA und 1  $\mu\text{g}$  Poly(d(I-C)) als unspezifische Kompetitor-DNA. Je nach Versuch wurde dem Ansatz 0.23  $\mu\text{M}$  rekombinantes TBP, 0.13  $\mu\text{M}$  rekombinantes TFB, 0.008  $\mu\text{M}$  RNAP und 0.74, 1.9, oder 3.7  $\mu\text{M}$  rekombinantes Phr zugegeben. Die Bindereaktion erfolgte für 30 min bei 70°C im Thermocycler. Die DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend auf einem nicht denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie ausgewertet.

Um die verkürzte Variante von Phr (siehe 13.2) auf seine Bindefähigkeit zu testen, wurden EMSAs mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (wt 35bp), die das Phr-Bindemotiv des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors beinhalten, verwendet. Es wurden jeweils 500 ng Phr oder Phr<sub>AS1-96</sub> eingesetzt; der EMSA erfolgte wie oben beschrieben.



## 8.2 EMSA mit fluoreszenz markierter DNA

Zum Nachweis der Phr-Bindung an andere Promotorsequenzen wurden EMSAs mit fluoreszenz markierter DNA durchgeführt. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 verwendet. Die Herstellung der DNA-Matrizen erfolgte über PCR aus Plasmid-DNA (s. Absatz 2) mit den Primern M13\_F und M13\_R, wobei der Primer M13\_F am 5'-Ende eine Cy5-Gruppe trug. Die PCR-Produkte wurden mit einem PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt. Jeweils 3 µl gereinigtes PCR-Produkt wurden pro Bindereaktion eingesetzt. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 250 ng. Die weiteren Bindebedingungen entsprachen denen der radioaktiven EMSAs. Die Quantifizierung der DNA-Bindung erfolgte mit dem Phosphoimager bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm und einem Filter für Licht der Wellenlänge von 685 nm.

## 9. Primer Extension

Zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Hitzeschockgene *in vitro* wurden Primer Extension-Analysen durchgeführt (LANE et al. 1985). Zunächst wurden die Transkripte in einer *in vitro*-Transkription ohne Zusatz von radioaktivem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP synthetisiert. Die Nukleotidkonzentration betrug für jedes Nukleotid in diesem Ansatz 0.44 mM. Die Transkripte wurden anschließend zusammen mit den entsprechenden radioaktiv endmarkierten Oligonukleotiden durch eine Ethanolfällung präzipitiert. Es wurden die Oligonukleotide ATPR1 (komplementär zu den Nukleotiden +139 bis +159 des *aaa<sup>+</sup> atpase* Gens), 20R1 (komplementär zu den Nukleotiden +116 bis +136 des *hsp20* Gens) und PfPr1R (komplementär zu den Nukleotiden +107 bis +126 des *phr* Gens) verwendet. Die Präzipitate wurden in je 10 µl Hybridisierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 2.5 mM EDTA) resuspendiert. Es erfolgte eine Denaturierung der Ansätze für 3 min bei 85°C im Thermocycler und anschließend eine 10minütige Hybridisierung der Oligonukleotide an die RNA bei 55°C. Nach einer Abkühlung der Ansätze auf 37°C wurden je 3,6 µl des Reverse Transkriptase-Reaktionsgemisches, bestehend aus 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2.5 mM), 1,2 µl AMV-Reaktionspuffer (500 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 1 µl Actinomycin D (680 ng/µl), 0,2 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl AMV Reverse Transkriptase (5 U/µl) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Die Ansätze wurden in Gegenwart von je 14 µl 0,6 M NaAc mit 80 µl 96% Ethanol gefällt, in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 10 µl Auftragspuffer resuspendiert. Die Analyse

der Produkte der Reversen Transkriptase erfolgte auf einem 6%igen Polyacrylamid-Harnstoffgel zusammen mit einem Sequenzstandard.

Die Primer Extension-Methode wurde auch zur Analyse von *in vivo*-RNA verwendet, um quantitative Aussagen über die Expression einer bestimmten RNA *in vivo* machen zu können (siehe Abschnitt III.7.1). Hierzu wurden 30 µg Gesamt-RNA von *P. furiosus* pro Primer Extension-Experiment eingesetzt. Zur Quantifizierung der Primer Extension-Produkte diente ein Phosphoimager (FLA-5000, Fuji).

## 10. DNaseI-Footprints

Für die DNaseI Footprinting-Experimente wurde der Promotor des *aaa<sup>+</sup>atpase* Gens durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Um jeweils nur einen DNA-Strang radioaktiv zu markieren, wurden in der PCR ein zuvor mit T4 Polynukleotidkinase und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP markierter Primer und ein unmarkierter Primer eingesetzt. Für den codierenden Strang wurden der markierte Primer ATPF2 und der unmarkierte Primer M13/pUCrev verwendet und für den codogenen Strang der markierte Primer ATPR1 und der unmarkierte Primer M13/pUCf. Die markierte DNA für die Footprint-Analyse des codierenden Stranges des *aaa<sup>+</sup>atpase* Gens bestand durch diese Primerwahl aus der Region von -95 bis +225. Bei dem codogenen Strang wurde die Sequenz von -236 bis +160 amplifiziert. Die PCR Produkte wurden zur Reinigung auf ein natives 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, nach der Elektrophorese aus diesem ausgeschnitten und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA) eluiert. Es schloss sich eine Ethanolfällung der DNA an. In einen Footprinting-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden etwa 10 ng dieser gereinigten DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt außerdem 40 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 325 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 5% Polyethylenglycol (PEG) 8000 und 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. Je nach Fragestellung enthielten die Reaktionsansätze 0.93 µM TBP, 0.55 µM TFB, und/oder 3.7 µM Phr. Die Bindung der Proteine an die DNA erfolgte für 30 min bei 70 °C. Im Anschluss daran wurden 0.1 U DNaseI zugegeben und die Ansätze weitere 30 sec bei 70 °C inkubiert. Durch Zugabe von 18 µl Stopplösung (1.5 M NH<sub>4</sub>Ac, 70 mM EDTA, pH 8.0 and 114 ng/µl tRNA) wurde die DNaseI-Hydrolyse gestoppt. Die Proben wurden phenolisiert, mit Ethanol gefällt, in Auftragspuffer (98% Formamid, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol, 10 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert, denaturiert und auf einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Als Größenstandard wurde parallel eine Sequenzreaktion des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors aufgetragen, die mit den

entsprechenden Primern synthetisiert wurde. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie.

## 11. Western Blot

*Pyrococcus furiosus* Zellen, die in unterschiedlichen Wachstumsphasen und bei verschiedenen Temperaturen geerntet wurden, wurden in PBSEG-Puffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% Glycerin) resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung im Branson Sonifier 250 wurden die Zellen aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde für 15 min bei 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand für die Western Blot-Experimente verwendet. Pro Ansatz wurden 20 µg Zelllysate auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Semi-Dry-Blotting wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde im Anschluss zweimal in TBST-Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) gewaschen und über Nacht in Blockierungslösung (TBST + 5% (w/v) Magermilchpulver) geschüttelt. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, Anti-Phr IgG, für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungslösung. Durch anschließendes zweimaliges Waschen in TBST und in Blockierungslösung wurden nicht spezifisch gebundene Antikörper entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG, POD-gekoppelt) erfolgte anschließend für eine Stunde. Der sekundäre Antikörper wurde 1:7500 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach weiteren vier Waschschritten in TBST-Puffer erfolgte der Chemilumineszenz-Nachweis nach Angaben des Herstellers (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Boehringer Mannheim). Die Ergebnisse wurden mit einem Phosphorimager quantifiziert.

## 12. *In vivo* Crosslinking-Versuche

Bei diesen *in vivo*-Analysen wurden lebende *Pyrococcus furiosus*-Zellen durch eine Formaldehydbehandlung fixiert. Dabei wurden alle Protein-Protein- und Protein-DNA-Komplexe kovalent miteinander vernetzt. Nach dem Zellaufschluss und dem gleichzeitigen Scheren der DNA durch eine Ultraschallbehandlung wurden die Phr-DNA-Komplexe mit Antikörpern gegen Phr immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch Bindung an Protein A-Sepharose-Kügelchen isoliert. Anschließend wurde die Quervernetzung aufgehoben, die Proteine wurden hydrolysiert und die DNA wurde aus den Ansätzen gereinigt. Durch PCR wurde überprüft, ob in der angereicherten DNA die bekannten Phr-Bindesequenzen vorhanden sind, d.h. also, ob Phr zum Zeitpunkt der Formaldehydfixierung an diese Sequenzen gebunden war. Durch eine Erweiterung dieser ChIP- (Chromatinimmunpräzipitations-) Experimente, bei der die Gesamtheit der Immunpräzipitate durch linkerspezifische PCR mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde, wurde es möglich, diese Methode mit der Microarray-Technik zu verbinden (ChIP to chip) und so genomweit die Phr-Bindung zu untersuchen.

In Abbildung 3 sind alle Schritte der ChIP- und der ChIP to chip-Methode in einer schematischen Darstellung zusammengefasst.

### 12.1 Formaldehydfixierung von Phr-DNA-Komplexen und Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

*Pyrococcus furiosus*-Zellen wurden in einem 45 Liter Fermenter angezogen (FIALA und STETTER, 1986). Bei einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^8$  Zellen pro ml Medium wurden über eine Schlauchpumpe 100 ml 37%ige Formaldehydlösung (Endkonzentration 0,1%) hinzugepumpt. Sollten die *Pyrococcus furiosus*-Zellen während eines Hitzeschocks (105-108°C) fixiert werden, so wurde der Fermenter bei einer Zelldichte von etwa  $1 \times 10^8$  Zellen pro ml Medium auf die entsprechende Temperatur hochgeheizt. Die Fixierung erfolgte dann 30 min nach Erreichen der erhöhten Temperatur. Nach einer Einwirkzeit des Formaldehyds von 20 sec wurden durch den gleichen Schlauch, durch den auch das Formaldehyd in den Fermenter gelangt war, 200 ml 2.5 M Glycin zugegeben, um die Quervernetzungsreaktion zu stoppen. Die fixierten Zellen wurden abgekühlt und über eine Durchlaufzentrifuge (Heraeus) geerntet. Das Zellpellet wurde zunächst in flüssigem Stickstoff, dann bei -80°C eingefroren.

Zur Weiterbehandlung wurden je circa 1 g mit Formaldehyd fixierte Zellen aufgetaut und dreimal in kaltem PBS-Puffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7, 150 mM NaCl) gewaschen. Durch eine Ultraschallbehandlung für 12 x 15 sec (Branson Sonifier, constant duty cycle, output control 2.5) wurden die Zellen aufgeschlossen und die DNA gesichert. Unlösliche Bestandteile wurden in einer 15 minütigen Zentrifugation bei 4°C pelletiert. Um noch kleinere DNA-Fragmente, die im Mittel um die 600 bp groß waren, zu erhalten, wurde im Anschluss an die Ultraschallbehandlung zusätzlich eine Hydrolyse der DNA mit *Micrococcus*-Nuklease vorgenommen. Hierzu wurde das Zelllysats mit 3 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und bei 37°C mit 1U *Micrococcus*-Nuklease pro 100 µg Zelllysats inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Der Erfolg der DNA-Scherung und -Hydrolyse wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

Die Konzentration des Lysats wurde durch Verdünnung in PBS-Puffer auf circa 200 ng/µl DNA eingestellt und je 500 µl zur Vorreinigung mit 30 µl einer 10%igen Protein A-Sepharose-Lösung für eine Stunde schüttelnd bei 4°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation der Ansätze in der Tischzentrifuge wurden die Überstände für die Immunpräzipitation verwendet.

Ein Immunpräzipitationsansatz setzte sich aus 500 µl Zelllysats (ca. 200 ng/µl), 1 mM PMSF und circa 15 ng des jeweiligen Antikörpers zusammen. Die Ansätze wurden für eine Stunde, teilweise auch über Nacht, bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl einer 10%igen Protein A-Sepharose Lösung wurden die Ansätze für eine Stunde unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Dabei bindet das Protein A mit hoher Affinität die Antikörper. In einer Tischzentrifuge wurden die Protein A-Sepharose-Kügelchen (mit den gebundenen Immunkomplexen) dann für 2 min bei 2000 rpm pelletiert, anschließend der Überstand abgenommen und das Pellet mehrmals gewaschen. Die Waschschriffe erfolgten zweimal mit Lyse-Puffer (0.1% (w/v) Desoxycholat, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100) und je einmal mit Lyse-Puffer 500 (0.1% (w/v) Desoxycholinsäure, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100), mit LiCl-Detergenz-Waschpuffer (0.5% (w/v) Desoxycholinsäure, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris/Cl pH 8) und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA). In jedem Waschpuffer wurde das Pellet resuspendiert, 5 min geschüttelt und danach abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Puffer besonders sorgfältig entfernt und auf das Pellet 100 µl Elutionspuffer (10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 50 mM Tris/Cl pH 8) gegeben und gemischt, um die Immunkomplexe von der Protein A-Sepharose zu eluieren. Es erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 65°C für 10 min. Die Proben wurden für 20 sec bei 13000

rpm zentrifugiert und das Eluat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf die pelletierten Protein A-Sepharose-Kügelchen wurden 150 µl TE/0,67% SDS gegeben und die Ansätze erneut für 20 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser zweite Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt. Die vereinigten Überstände werden im Folgenden als Präzipitate bezeichnet.

50 µl Zellysat, mit dem keine Immunpräzipitation vorgenommen wurde, wurden mit 200 µl TE/1% SDS versetzt und zusammen mit den Präzipitaten weiterbehandelt. Diese Probe diente später in der PCR als Positivkontrolle (= Input).

Um die Formaldehydfixierung wieder aufzuheben, erfolgte eine Inkubation der Proben (Präzipitate und Input) über Nacht bei 65°C im Wärmeschränk. Proteine wurden dann während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C mit jeweils 250 µl Proteinase K-Lösung, bestehend aus 0,5 µl 20 mg/ml Glykogen, 5 µl 20 mg/ml Proteinase K und 244,5 µl TE pH 8, abgebaut. Die Präzipitate und die Positivkontrollen wurden anschließend mit 55 µl 4 M LiCl und 500 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:25:1) versetzt, mit einem Vortexer gemischt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem die obere DNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt worden war, schloss sich eine Ethanolfällung der DNA an. Die DNA in den Präzipitat-Ansätzen wurde in je 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA) resuspendiert und stand nun für den Nachweis durch PCR zur Verfügung.

Das Pellet der Ansätze, die als Positivkontrolle dienten, wurde in 50 µl TE/0,2 mg/ml RNaseA resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert, um noch vorhandene RNA zu entfernen. Nach Zugabe von 950 µl TE konnte auch die Positivkontrolle in die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Die DNA-Konzentrationen der Präzipitate wurden mit dem Fluorometer (TD700, Turner Designs) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

## **12.2 Analyse der Präzipitate durch spezifische PCR**

Zum Nachweis der Promotorsequenzen in den Präzipitaten wurden Standard-PCR-Reaktionen durchgeführt. Ein PCR-Ansatz bestand aus 2 µl Präzipitat (ca. 130 pg DNA) oder 0,5 µl der DNA aus der Positivkontrolle (Proben aus 12.1), 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer für die *Taq*-DNA-Polymerase, 2,5 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2 mM), 1,25 µl Vorwärts-Primer (10 µM, *atp\_NEW\_F*, *hsp20\_NEW\_F*, *phr\_NEW\_F* oder *gdh\_NEW\_F*), 1,25 µl Rückwärts-Primer (10 µM, *atp\_NEW\_R*, *hsp20\_NEW\_R*, *phr\_NEW\_R* oder

gdh\_NEW\_R), 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (1U/µl) und H<sub>2</sub>O ad 25 µl. Die PCR wurde im Mastercycler personal von Eppendorf durchgeführt. Es erfolgte zunächst eine Denaturierung für 3 min bei 95°C. Darauf folgten 25 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt (30 sek, 95°C), einem Hybridisierungsschritt (30 sek, 55°C) und einem Elongationsschritt (60 sek, 72 °C). Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Ansätze auf konstant 4°C heruntergekühlt.

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des Phosphoimagers analysiert.

### **12.3 Präparation der präzipitierten DNA für genomweite Analyse (ChIP to chip)**

Die präzipitierte DNA sollte nicht nur spezifisch auf bekannte Phr-Bindestellen hin untersucht werden. Ein weiterer Ansatz war es, neue Phr-Bindestellen zu identifizieren. Dieses erfolgte in sogenannten „ChIP to chip-Experimenten“. Die gesamte DNA aus dem Präzipitat musste zunächst amplifiziert und markiert werden und dann mit einem DNA-chip, der das vollständige *Pyrococcus furiosus*-Genom enthält, hybridisiert und in Microarrays analysiert werden. Die ChIP to chip-Analysen wurden modifiziert nach REN et al. (2000) durchgeführt. Sie erfolgten in Kooperation mit dem Labor von Professor Michael Adams, University of Georgia.

#### **12.3.1 Auffüllreaktion der überhängenden DNA-Enden**

Zu 40 µl der mit Anti-Phr präzipitierten DNA und 1 µl der Kontroll-DNA (= Input) aus 12.1 wurde H<sub>2</sub>O ad 100 µl gegeben. In einem ersten Schritt wurden die überhängenden Enden der präzipitierten DNA in einer T4 DNA-Polymerase-Reaktion aufgefüllt. Dazu wurden zu den 100 µl DNA 11 µl 10fach T4 DNA-Polymerase-Puffer, 0.5 µl BSA (10 mg/ml), 0.5 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 20 mM) und 0.2 µl T4 DNA-Polymerase (3 U/µl) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 12°C in einem Thermocycler. Die Proben wurden auf Eis gelagert, und es wurden je 11.5 µl 3 M NaAcetat, 0.5 µl Glycogen (20 mg/ml) und 120 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen und Zentrifugation für 5 min in der Tischzentrifuge wurde die obere, wässrige Phase

abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es schloss sich eine Ethanolfällung der DNA an. Das Pellet wurde schließlich in 25 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **12.3.2 Präparation und Ligation von DNA-Linkern an die präzipitierte DNA**

Je 375 µl der Oligonukleotide Linker1 und Linker2 (siehe II.4) (je 40 µM) wurden mit 250 µl Tris-HCl (1 M, pH 8) gemischt und in 50 µl-Aliquots bei 95°C für 5 min in einem Thermoblock erhitzt. Anschließend wurden die Proben in einen 70°C heißen Thermoblock überführt und dieser bei Raumtemperatur solange stehen gelassen, bis eine Temperatur von 25°C erreicht war. Der Thermoblock wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Die hybridisierten Linker wurden bei -20 °C gelagert.

Um die präzipitierte DNA an ihren Enden mit den Linkern zu versehen, wurden zu den 25 µl DNA-Lösung aus 12.3.1 25 µl kalter Ligase-Mix, bestehend aus 8 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 5fach Ligase-Puffer, 6.7 µl hybridisierte Linker-DNA (15 µM) und 0.5 T4 DNA-Ligase, hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### **12.3.3 Linkervermittelte PCR**

Zu der mit Linkern ligierten DNA (Ansätze aus 12.3.2) wurden 6 µl NaAcetat (3 M, pH 5.2) und 130 µl 99% Ethanol gegeben. Die Ansätze wurden für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 25 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Eis gelagert. Zu der resuspendierten DNA wurden 4 µl 10fach ThermoPol-Reaktionspuffer, 6.25 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, je 5 mM; dTTP 2 mM), 1 µl Cy5-dUTP im Fall der immunpräzipitierten DNA oder Cy3-dUTP im Fall der Kontroll-DNA sowie 1.25 µl Linker1 (40 mM) gegeben und gemischt. In einem Thermocycler wurden die Proben zunächst auf 55°C erhitzt und dann 8 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl 10fach ThermoPol-Reaktionspuffer, 1 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 0.01 µl PFU Turbo Polymerase (2.5 U/µl) pro Ansatz hinzugegeben. Es schloss sich eine Inkubation bei 72°C für 5 min und dann eine zweiminütige bei 95°C an. Weiterhin folgten im Fall einer Markierung mit Cy5 33 Zyklen von 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 55°C und 1 min bei 72°C. Im Fall einer Markierung mit Cy3 wurde die PCR mit 35 Zyklen durchgeführt. Die PCR wurde überprüft, indem jeweils 5 µl PCR-Produkt auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert wurden. Die



PCR-Produkte sollten einen Schmier auf dem Agarosegel im Bereich von 200 bis 600 Basenpaaren zeigen. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem PCR-Purification Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Eluiert wurde in einem Volumen von 90 µl. Es folgte eine photospektrometrische Analyse der DNA-Konzentrationen und der Rate der eingebauten Cy-Farbstoffe. Die Mengen an eingebautem Cy3 und Cy5 wurden dabei mit folgender Formel berechnet:

$$A_{550} \times (\text{Gesamtvolumen der Probe in } \mu\text{l}) / 0.15 = \text{pmol eingebautes Cy3}$$

$$A_{650} \times (\text{Gesamtvolumen der Probe in } \mu\text{l}) / 0.25 = \text{pmol eingebautes Cy5}$$

Die Cy3- und Cy5-markierten Proben wurden in einer Konzentration von jeweils 20 pmol eingebautem Cy-Farbstoff zusammengegeben und vermischt. Diese Probe wurde mit Ethanol gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Probe wurde zum Einsatz in Microarray Analysen zu unseren Kooperationspartnern des Labors von Professor Michael Adams, University of Georgia, geschickt.

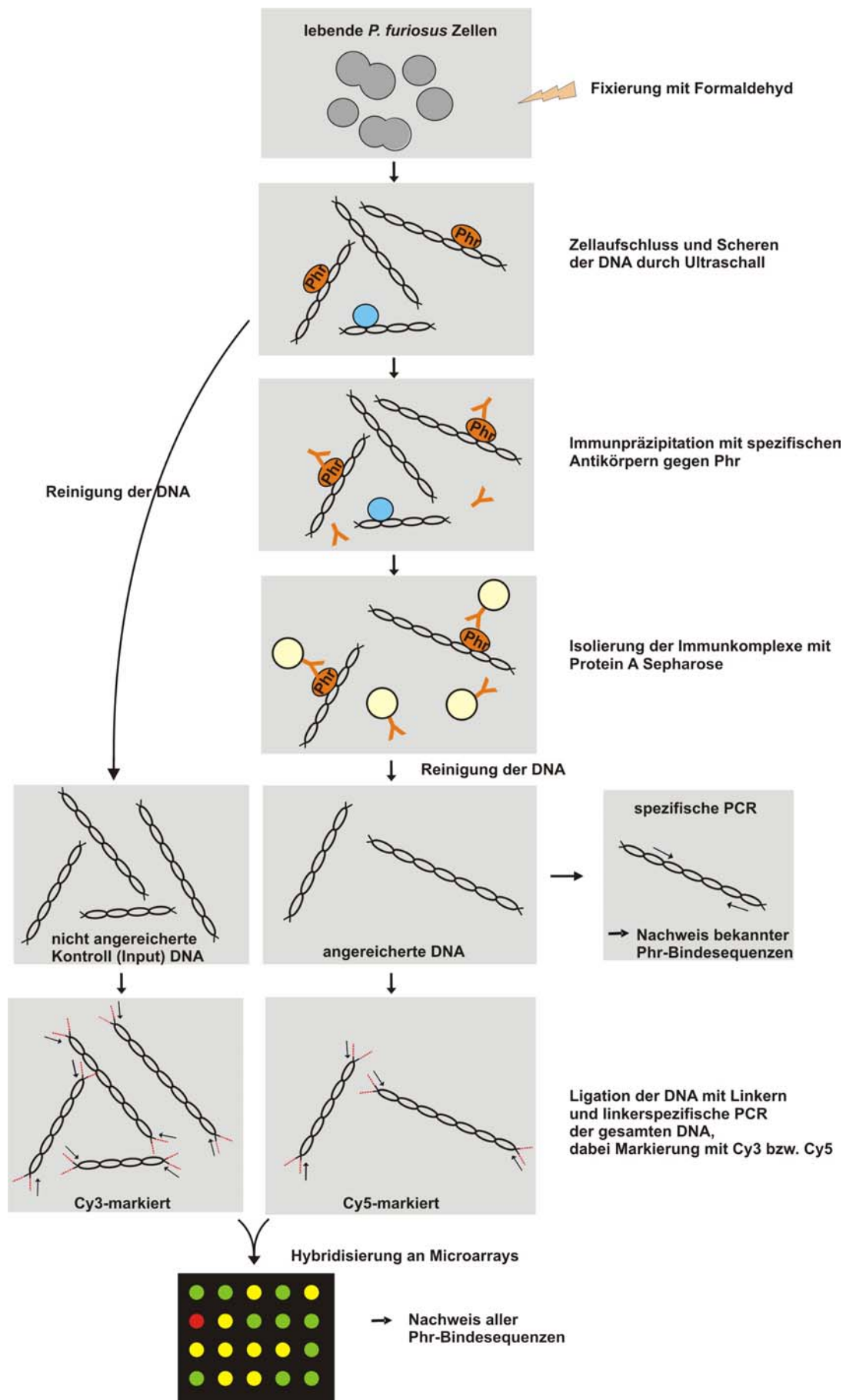


Abb. 3: Schematische Darstellung der *in vivo* Crosslinking-Versuche zum Nachweis bekannter und unbekannter Phr-Bindesequenzen.

### 13. Konstruktion von Phr-Varianten zur Struktur- und Funktionsaufklärung

In Kooperation mit dem Labor von Professor Rudolf Ladenstein (Karolinska Institut, Huddinge, Schweden) sollte Phr kristallisiert und die dreidimensionale Struktur ermittelt werden. Zu diesem Zweck mussten verschiedene veränderte Varianten von Phr hergestellt werden.

#### 13.1 Selenomethionin-Markierung von Phr

Zur Strukturaufklärung von Phr war die Methode der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (engl.: „multiwavelength anomalous dispersion“ MAD; HENDRICKSON, 1991) notwendig. Um diese Methode anwenden zu können, musste ein Schweratom in der Proteinstruktur vorhanden sein. Die im Phr fünfmal vorkommende Aminosäure Methionin wurde deshalb durch das Aminosäureanalogon Selenomethionin ersetzt.

Eine gängige Methode zur Produktion von Selenomethionin (SeMet)-Proteinen ist die Verwendung eines Methionin auxotrophen *E. coli*-Stammes (BUDISA et al., 1995). Da diese Stämme aber oftmals sehr langsam wachsen oder das rekombinante Protein in zu geringer Menge exprimieren (GUERRERO et al., 2001), wurde hier eine andere Methode verwendet. Diese Methode benötigt keinen Methionin auxotrophen *E. coli*-Stamm und basiert auf der Blockierung der Methioninbiosynthese durch Hemmung der Aspartatkinase in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Isoleucin, Lysin und Threonin. Methionin wird bei der rekombinanten Expression durch Selenomethionin ersetzt (VAN DUYNE et al., 1993).

Für die Expression dieses Proteins wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)plysE Phr/17b (VIERKE et al., 2003) verwendet. Es wurde eine Einzelkolonie dieses Stammes in 5 ml LB-Medium (1% Bacto Trypton, 0.5% Bacto Hefeextrakt, 0.5% NaCl, pH 7.5) mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml M9-Medium (Minimalmedium aus 7.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g NaCl, 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 100 ml 4% (w/w) Glukoselösung, 100 µl 0.5% (w/v) Thiamin HCl-Vitaminlösung, 1 ml FeSO<sub>4</sub>-Lösung (4.2 g/l) ad 1 Liter) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in einen Kolben mit 400 ml M9-Medium, das mit den oben genannten Antibiotika versetzt war, gegeben. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C. War eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2 bis 0,3 erreicht, wurden der Kultur Aminosäuren in fester Form beigelegt (L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Threonin je 100 mg/l, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Valin und L-Selenomethionin je 50 mg/l).

15 min nach Zugabe der Aminosäuren erfolgte die Induktion durch 1 mM IPTG. Die Zellen wurden weitere vier Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert und dann geerntet.

Die Zellen aus sechs Ansätzen wurden in insgesamt 40 ml Natriumphosphatpuffer mit DTT (50 mM Natriumphosphat pH 7.2, 5 mM DTT) resuspendiert. Das DTT musste im Puffer enthalten sein, um die Oxidation von Selenomethionin zu verhindern. Durch zweimalige French Press-Behandlung wurden die Zellen aufgeschlossen und im Anschluss daran für 60 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Es folgte eine Vorreinigung des Zellaufschlusses durch eine Hitzedenaturierung für 15 min bei 75°C. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 15 min bei 20000 rpm wurde der Zellaufschluss durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,4 µm) filtriert und das Selenomethionin-Phr über eine Heparinsäule (HiPrep 16/10 Heparin FF, Amersham) nach Anleitung des Herstellers mit einem Chromatographiesystem (ÄKTA Purifier, Amersham) aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft und die Proteinkonzentration nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Durch eine massenspektrometrische Analyse (Prof. Deutzmann, Regensburg) wurde verifiziert, dass alle fünf im Phr-Monomer vorkommenden Methioninreste durch Selenomethionin ersetzt worden waren.

### 13.2 Herstellung einer verkürzten Variante von Phr (Phr<sub>AS 1-96</sub>)

Für die Kristallisation des Phr-DNA-Komplexes wurde eine verkürzte Variante von Phr (Phr<sub>AS 1-96</sub>) hergestellt, die aus den Aminosäuren 1 bis 96, d.h. hauptsächlich aus dem N-terminalen HTH-DNA-Bindemotiv, besteht.

Durch PCR aus genomischer DNA von *Pyrococcus furiosus* wurde mit den Primern pftrexpl-F und pftrexpl-R4 die Sequenz des Phr-Gens bis zu Nukleotid 288 amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt sowie das Plasmid pET30a(+) (Novagen) wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I hydrolysiert. Nach Reinigung der geschnittenen Fragmente wurde die Gensequenz in den Vektor ligiert und das Plasmid anschließend in den *E. coli*-Stamm JM109 transformiert. Das Plasmid wurde zur Verifizierung der klonierten Sequenz von der Firma Geneart (Regensburg) ansequenziert.

Zur Expression des Phr<sub>AS 1-96</sub> wurde das Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21star(DE3)CP transformiert. Eine Einzelkolonie dieses Stammes wurde in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Vier Kolben mit je 400 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika wurden mit je 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C

inkubiert. Bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 wurde mit 1 mM IPTG induziert. Zwei Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde der Aufschluss für 60 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Mit dem Zelllysate wurde anschließend eine 15minütige Hitzedenaturierung bei 85°C vorgenommen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 20000 rpm wurde das Lysat mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,4  $\mu$ m) filtriert und chromatographisch gereinigt. Es wurde die Heparinsäule (HiPrep 16/10 Heparin FF, Amersham) nach Anleitung des Herstellers verwendet. 8-20%ige SDS-Gradientengele dienten zur Überprüfung der Proteinreinigung. Die Konzentrationsbestimmung des gereinigten Proteins erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Die Bindefähigkeit des (Phr<sub>AS 1-96</sub>) an den *aaa*<sup>+</sup> *atpase* Promotor wurde anschließend in einem EMSA (siehe 8.1) geprüft.

### 13.3 Phr mit C-terminalem His-Tag

Die Bindungsaffinität und -kinetik von Phr zu der DNA sollte durch Bioaffinitätsmessungen analysiert werden. Um das Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz (engl.: „Surface Plasmon Resonance“, SPR) anwenden zu können, war Voraussetzung, dass ein Bindepartner an eine Chipmatrix immobilisiert werden konnte. Das Phr mit dem N-terminalen His-Tag erschien für diesen Zweck nicht geeignet, da möglicherweise das ebenfalls N-terminal gelegene DNA-Bindemotiv nach Bindung des His-Tags an die Matrix nicht mehr frei zugänglich sein könnte. Daher wurde Phr mit einem C-terminalen His-Tag synthetisiert.

Zur Amplifikation der Gensequenz wurden die Primer pftrex1-F und Phr\_C-his\_r verwendet. Das mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I hydrolysierte Insert wurde in das entsprechend hydrolysierte Plasmid pET30a(+) (Novagen) kloniert. Nachdem die Gensequenz durch Sequenzierung (Geneart, Regensburg) verifiziert worden war, wurde das Plasmid aus dem Klonierungsstamm *E. coli* JM109 in den Expressionsstamm *E. coli* BL21star(DE3)CP umtransformiert. Die Expression erfolgte analog zur Expression des Phr<sub>AS 1-96</sub>. Die Reinigung des Proteins erfolgte nach einer Hitzevorbehandlung für 15 min bei 75°C durch Affinitätschromatographie über eine Nickelsäule (HisTrap FF, Amersham) nach Angaben des Herstellers. Zur Analyse des Proteins wurden 12%ige SDS-Gele verwendet. Die Konzentration wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt.

## III Ergebnisse

### 1. Sequenzanalyse von Phr

Das Protein Phr aus *Pyrococcus furiosus* (GenBank™ accession number Q8U030, open reading frame number PF1790) wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit kloniert und gereinigt (VIERKE, 2001). Phr besteht aus 202 Aminosäuren bzw. wird von einem offenen Leseraster (ORF = open reading frame) aus 609 Nukleotiden kodiert. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 24034 Dalton, der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 7,68.

In den Proteindatenbanken wird Phr den Transkriptionsregulatorproteinen der ArsR-Familie zugeordnet. Die ArsR-Familie bakterieller Transkriptionsregulatoren besteht aus verschiedenen Proteinen, die in Abhängigkeit von Metallionen DNA binden können. Charakteristisch ist das bei diesen Proteinen vorkommende winged Helix-Turn-Helix-Motiv (wHTH, auch winged Helix-Motiv genannt = wH), ein DNA-Bindemotiv, das auch bei Phr gefunden wird.

Bei BLAST (= Basic Local Alignment Search Tool)-Analysen mit der Phr-Sequenz finden sich einige Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu Phr. Die größten Sequenzähnlichkeiten zeigen Proteine aus anderen *Pyrococcus*-Arten sowie die Proteine MTH1288 aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und AF1298 aus *Archaeoglobus fulgidus* (siehe Tabelle 1).

Organismus	Anzahl der verglichenen Aminosäuren	ORF	% identisch	% ähnlich
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	198	PH1744	81	96
<i>Pyrococcus abyssi</i>	198	PAB0208	84	94
<i>Pyrococcus kodakarensis</i>	183	Q5JDC8	66	79
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	162	MTH1288	38	56
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	194	AF1298	32	56

**Tabelle. 1: Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der engsten Homologen zu Phr.** Es sind die prozentualen Werte für identische und ähnliche Aminosäuren der Homologen zu Phr angegeben. Die Werte wurden durch Vergleiche der Proteinsequenzen mit dem BLAST-Programm von NCBI (National Center for Biotechnology Information) ermittelt.

Die Proteine, die die nächstgrößten Ähnlichkeiten zu Phr aufweisen, sind ebenfalls alles euryarchaeelle Proteine. Sie stammen unter anderem aus *Methanosarcina*, *Halobacterium* und *Methanosphaera* (siehe Tabelle 2). Diese Proteine weisen fast über die gesamte Sequenz Ähnlichkeiten zu Phr auf, wobei die größten Sequenzähnlichkeiten eindeutig im Bereich des DNA-Bindemotivs liegen. Alle aufgeführten Proteine werden in die ArsR-Regulatorfamilie eingeordnet. In den Gattungen *Methanococcus*, *Methanopyrus* und *Thermoplasma* können dagegen keine Proteine mit Ähnlichkeiten zu Phr identifiziert werden. Neben den in Tabelle 1 und 2 aufgeführten euryarchaeellen Proteinen, die über einen Sequenzbereich von mindestens 140 Aminosäuren Ähnlichkeiten zu Phr aufweisen, können durch die BLAST-Analysen viele Proteine identifiziert werden, die ausschließlich im Bereich des wHTH-DNA-Bindemotivs Sequenzübereinstimmungen mit Phr zeigen. Hierbei handelt es sich um Proteine der ArsR-Familie, die vor allem aus grampositiven Bacteria, wie *Thermoanaerobacter*, *Clostridium* oder *Frankia* stammen. Es konnten keine bakteriellen oder eukaryotischen Proteine identifiziert werden, die über einen größeren Bereich als den des wHTH-Motivs Ähnlichkeiten zu Phr haben.

Organismus	Anzahl der verglichenen Aminosäuren	ORF	% identisch	% ähnlich
<i>Methanosarcina barkeri</i>	174	Mbar_A0909	35	56
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	140	VNG1843C	42	63
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	140	Msp_1519	37	57
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	145	MA4576	35	61
<i>Methanosarcina mazei</i>	174	MM1257	33	56
<i>Haloferax volcanii</i>	160	AAL35835	38	57
<i>Haloarcula marismortui</i>	194	YP_137831	34	53
<i>Methanospirillum hungatei</i>	146	ZP_00868788	29	56

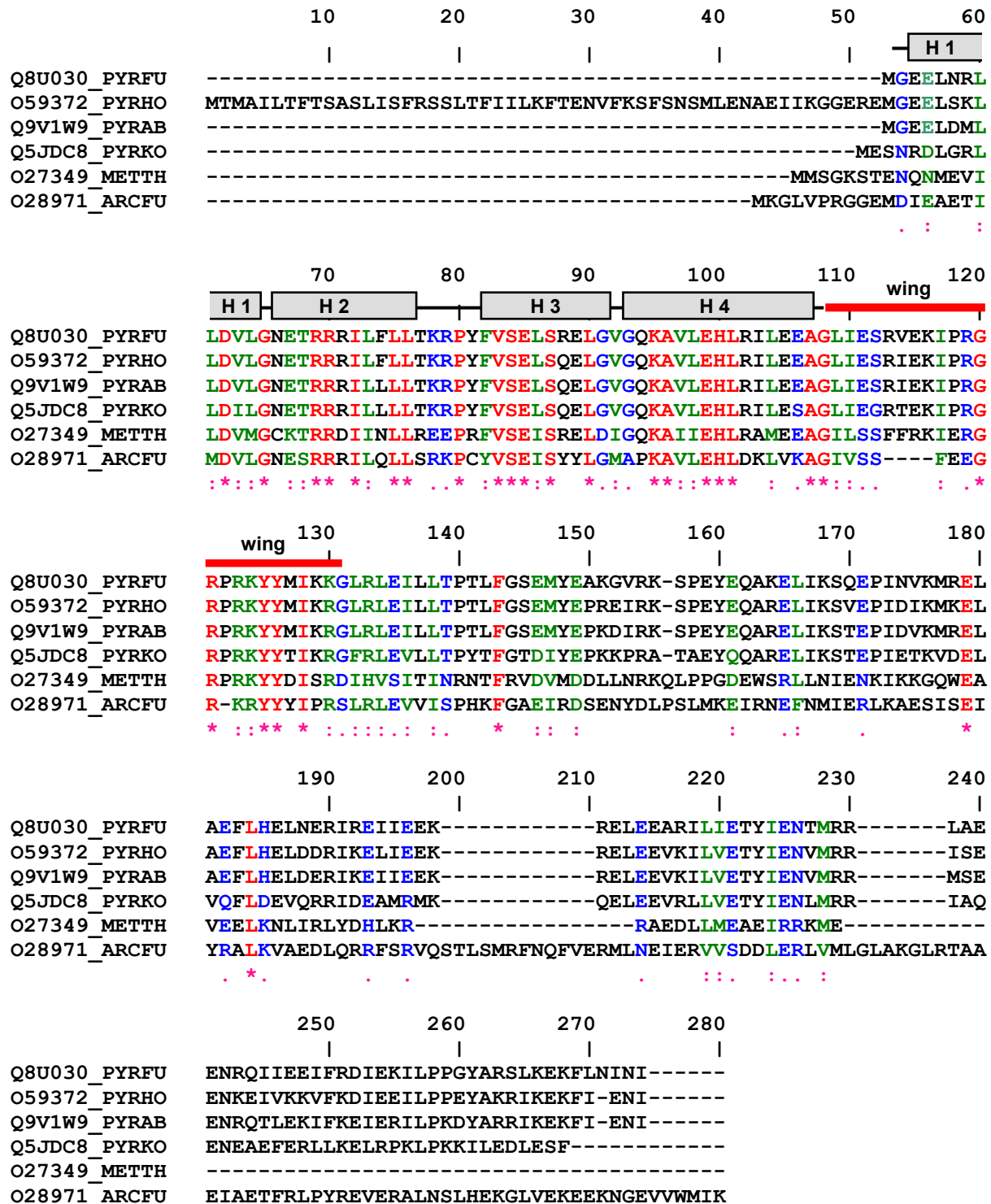
**Tabelle. 2: Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz von verschiedenen euryarchaeellen Proteinen zu Phr.** Es sind die prozentualen Werte für identische und ähnliche Aminosäuren der Homologen zu Phr angegeben. Die Werte wurden durch Vergleiche der Proteinsequenzen mit dem BLAST-Programm von NCBI (National Center for Biotechnology Information) ermittelt.

Mit Phr und den fünf zu Phr homologen Proteinen aus Tabelle 1 wurde ein Sequenzvergleich vorgenommen. Der Vergleich (Abbildung 4) zeigt, dass die größte Übereinstimmung dieser sechs euryarchaeellen Proteine im Bereich des DNA-Bindemotivs zu finden ist. Aber auch im zentralen sowie am C-terminalen Bereich des Proteins treten Sequenzübereinstimmungen auf. Die Homologen von Phr aus *M. thermoautotrophicus* und *A. fulgidus* liegen im Genom in enger Nachbarschaft zu Hitzeschockgenen. Die kodierende Sequenz für das Protein MTH1288 liegt direkt vor dem bei *M. thermoautotrophicus* vorkommenden *grpE-dnaK-dnaJ*-Operon, allerdings in umgekehrter Orientierung. Der ORF für *A. fulgidus* AF1298 befindet sich unmittelbar stromaufwärts von den beiden Hitzeschockgenen *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20*. Diese drei Gene scheinen ein Operon zu bilden, zumal der *aaa<sup>+</sup>atpase* und dem *hsp20*-Gen eigene TATA-Boxen und Transkriptionsfaktor B-Erkennungselemente fehlen.

Phr liegt dagegen im *Pyrococcus furiosus*-Genom nicht in einem Operon mit anderen Hitzeschockgenen. Es liegt stromabwärts eines ORF für ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion und mit einem Abstand von ca. 600 Basenpaaren stromaufwärts von dem Gen für ein Enzym (Halidohydrolase) des Metabolismus. Es sind keine Sequenzen für Hitzeschockgene in direkter Nachbarschaft von Phr vorhanden.

Phr wurde sowohl ohne (VIERKE et al., 2003) als auch mit einem N-terminalen His-Tag (VIERKE, 2001) rekombinant exprimiert. In den nachfolgenden funktionellen Tests wurde hauptsächlich das etwa 26 kDa große, mit einem N-terminalen His-Tag fusionierte Phr eingesetzt, da dieses zuerst zur Verfügung stand.



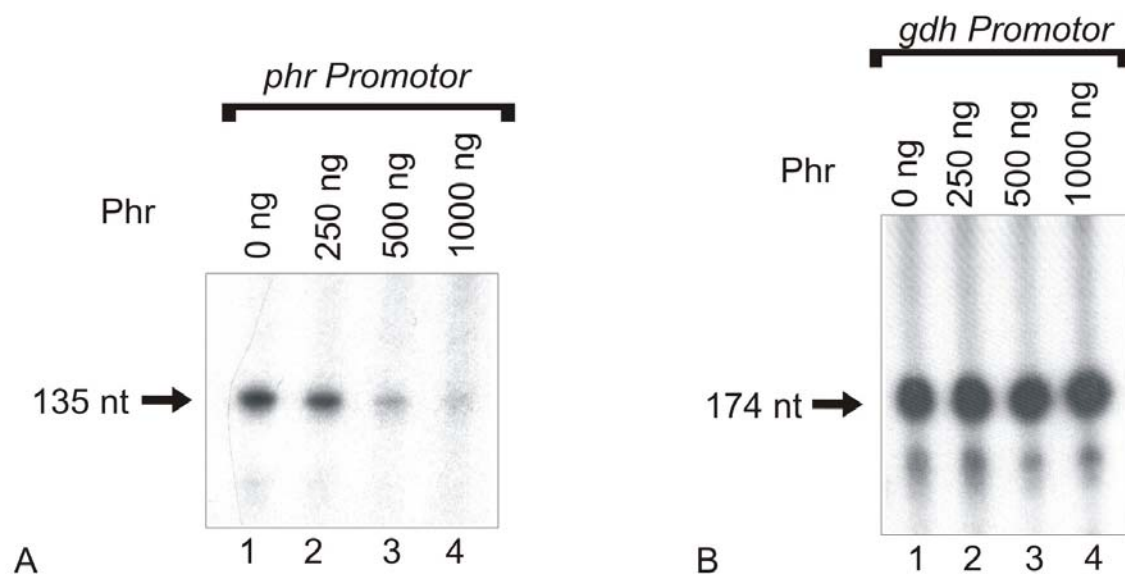


**Abb. 4: Sequenzvergleich von *Pyrococcus furiosus* Phr mit verschiedenen euryarchaeellen Homologen.** Die richtige Anordnung (alignment) wurde mit den Sequenzen, die in der BLAST-Analyse die größten Ähnlichkeiten zu Phr aufwiesen, erstellt. Es wurde das Programm CLUSTALW verwendet. Vor den Sequenzen sind die jeweiligen GenBank<sup>TM</sup> accession numbers und die Organismen (PYRFU: *P. furiosus*, PYRHO: *P. horikoshii*, PYRAB: *P. abyssi*, METTH: *M. thermoautotrophicus*, ARCFU: *A. fulgidus*) angegeben. In allen Sequenzen identisch vorkommende Aminosäuren sind in Rot gedruckt und unter den Sequenzen mit einem \* vermerkt. Besonders ähnliche Aminosäuren sind in Grün und ähnliche in Blau gedruckt und mit einem : bzw. einem . unter den Sequenzen vermerkt. Die Sequenzbereiche, die die Helices des wHTH-DNA-Bindemotivs ausbilden, sind durch graue Kästchen und Beschriftung H1 bis H4 über den Sequenzen markiert. Der Bereich des Flügels („wing“) des wHTH-Motivs ist durch eine rote Markierung und Beschriftung über den Sequenzen gekennzeichnet.

## 2. Phr reguliert die Transkription von Hitzeschockgenen, einschließlich die seines eigenen Gens, *in vitro*

Bereits VIERKE (2001) hatte nachgewiesen, dass Phr einen Einfluss auf die *in vitro*-Transkription des *hsp20*- und des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens hat. Phr hemmt die *in vitro*-Transkription dieser beiden im *Pyrococcus furiosus* Genom direkt hintereinanderliegenden Hitzeschockgene deutlich.

Bei bakteriellen Regulatorproteinen, vor allem bei Repressoren, ist die Autoregulation ein weit verbreiteter Mechanismus. Zur Überprüfung, ob auch Phr eine autoregulatorische Funktion hat, wurde die Transkription des *phr*-Promotors im zellfreien Transkriptionssystem untersucht. Analog zu den bei VIERKE (2001) beschriebenen Transkriptionsversuchen mit den Hitzeschockgenen *hsp20* und *aaa<sup>+</sup>atpase*, wurden auch den Transkriptionsansätzen mit dem *phr*-Promotor als Matrize verschiedene Mengen an Phr hinzugegeben.



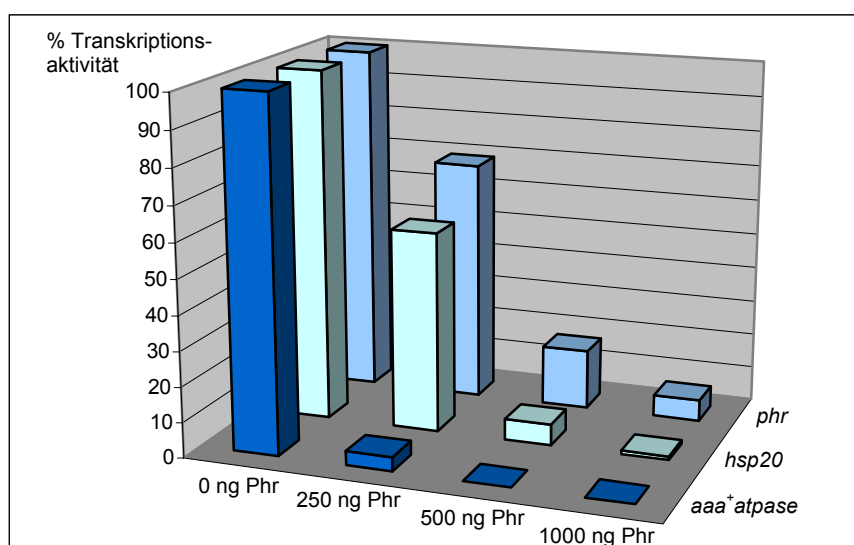
**Abb. 5: Phr hemmt die *in vitro*-Transkription seines eigenen Gens.** Autoradiogramm eines 8%igen PA-Harnstoff-Gels. Als Matrize für die *in vitro*-Transkription diente linearisierte Plasmid DNA mit dem Promotor des *phr*-Gens (A) bzw. dem Promotor des *gdh*-Gens (B). Die Größe der run-off-Transkripte wird durch Pfeile angezeigt. Den Transkriptionsansätzen wurden verschiedene Mengen an Phr (0, 250, 500 oder 1000 ng) hinzugegeben, wie über den einzelnen Spuren angegeben.

Die Zugabe von 500 ng Phr, was einer Konzentration von 0,75  $\mu$ M und einem Verhältnis von DNA zum Regulator von 1 zu 125 entspricht, führt deutlich zu einer Hemmung der Transkription am *phr*-Promotor (Abb. 5 A, Spur 3). Beim Einsatz der doppelten Menge an

Phr (1000 ng, Abb. 5 A, Spur 4) wird die Transkriptionshemmung verstärkt, die Transkription wird aber nicht vollständig unterdrückt.

Zur Kontrolle wurde Phr auch in die Transkriptionsreaktionen mit dem *gdh*-Promotor eingesetzt. An diesem Promotor zeigt Phr keinen Effekt (Abb. 5, B).

Die Transkriptionshemmung am *phr*-Promotor ist verglichen mit der Hemmung am *aaa<sup>+</sup>atpase*- und am *hsp20*-Promotor schwächer (vgl. Abb. 6). Während 1000 ng Phr (1,5  $\mu$ M) am *aaa<sup>+</sup>atpase*- und *hsp20*-Promotor eine vollständige bzw. fast vollständige Hemmung der Transkription bewirken, wird die Transkription am *phr*-Promotor nur zu 94% gehemmt.



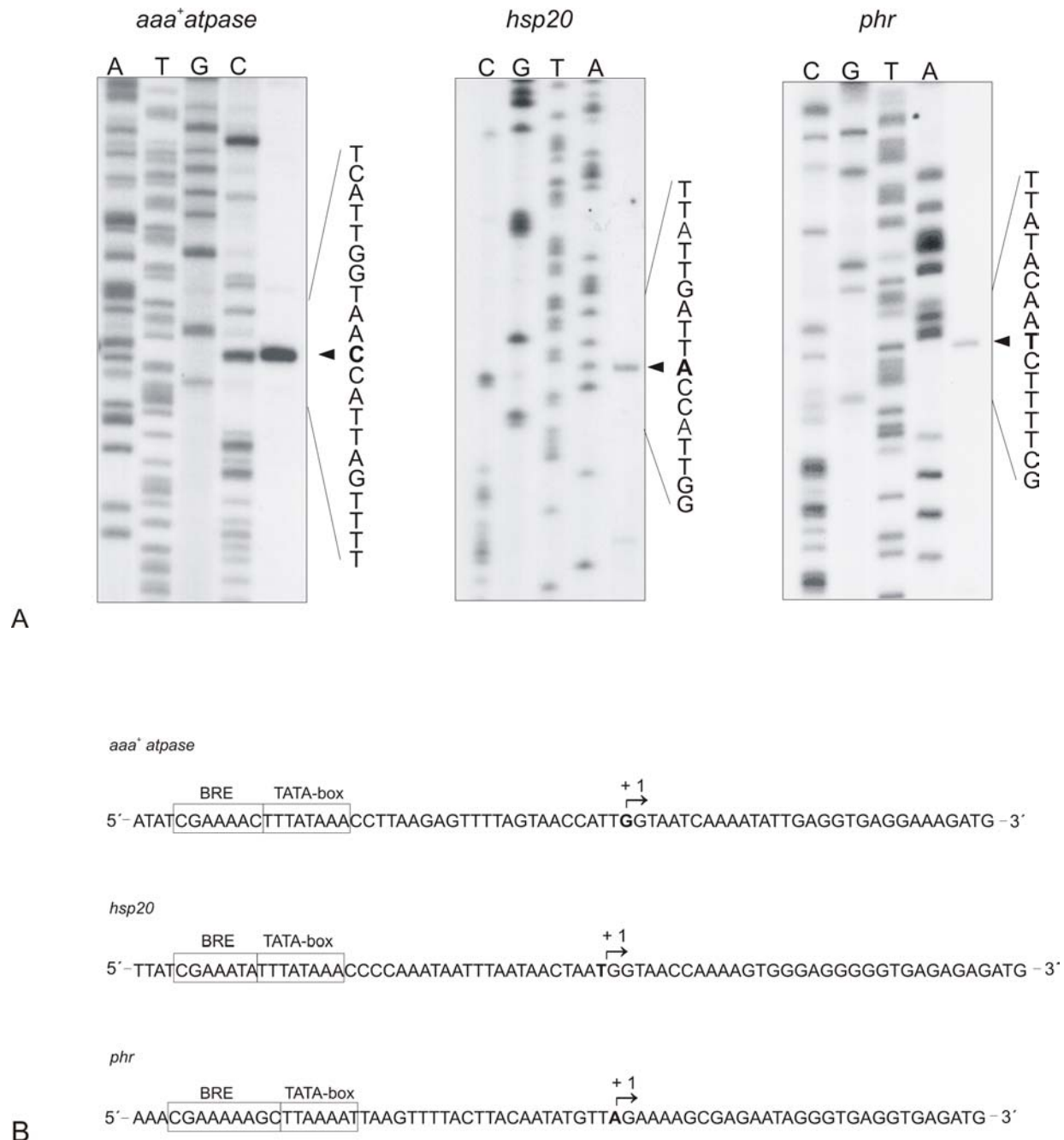
**Abb. 6:** Die Transkriptionshemmung durch Phr ist am *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor am stärksten. Quantifizierung der Transkriptionsaktivitäten am *aaa<sup>+</sup>atpase*-, *hsp20*- und *phr*-Promotor unter Einfluss verschiedener Mengen (0, 250, 500 oder 1000 ng) Phr. Die Quantifizierungen erfolgten mit Hilfe eines Phosphoimagers. Die Transkriptionsaktivität in Abwesenheit von Phr entspricht jeweils 100%.

### 3. Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Hitzeschockgene

Für weitere Untersuchungen der Transkriptionsregulation durch Phr war es erforderlich, die Transkriptionsstartpunkte der durch Phr regulierten Gene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* zu kennen. Die Transkriptionsstartpunkte dieser drei Gene wurden durch Primer Extension Analysen bestimmt (s. Abb. 7).

Anhand der Sequenzstandards, die jeweils mit den gleichen wie in den Primer Extension-Reaktionen eingesetzt, markierten Oligonukleotiden erstellt wurden, konnte direkt das

jeweilige Startnukleotid abgelesen werden. Die Sequenzreaktionen zeigen die Sequenzen des codogenen DNA-Stranges.



**Abb. 7: Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte des *aaa<sup>+</sup>atpase*-, *hsp20*- und *phr*-Promotors.** (A), Primer Extension-Experimente von *in vitro*-Transkriptionsprodukten. Die Primer Extension Produkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die mit A,T,G und C gekennzeichneten Spuren repräsentieren die Sequenzreaktionen, die mit den gleichen Primern synthetisiert wurden, die auch bei den Primer Extension-Experimenten verwendet wurden. Die Sequenzen des codogenen Stranges sind jeweils rechts neben den Autoradiogrammen dargestellt. Die Startnukleotide sind durch fette Buchstaben gekennzeichnet. (B), Zusammenfassung der Primer Extension-Daten. In den Promotorsequenzen des *aaa<sup>+</sup>atpase*-, *hsp20*- und *phr*-Gens sind die Startnukleotide (+1) fett gedruckt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Positionen von TATA-Boxen und BRE sind durch Umrandungen markiert.

Für das *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gen wurde ein Guaninrest als Startpunkt der Transkription (+1) bestimmt. Er liegt 24 bp stromabwärts der TATA-Box und 28 bp stromaufwärts des Translationsstarts. Der Transkriptionsstartpunkt des *hsp20*-Gens ist ein Thyminrest 23 bp stromabwärts der TATA-Box und 31 bp stromaufwärts des Translationsstarts, der des *phr*-Gens ein Adenosinrest, welcher sich 23 bp stromabwärts der TATA-Box und 27 bp stromaufwärts des Translationsstarts befindet (vgl. Abb.7 B).

#### **4. Phr-Bindung *in vitro***

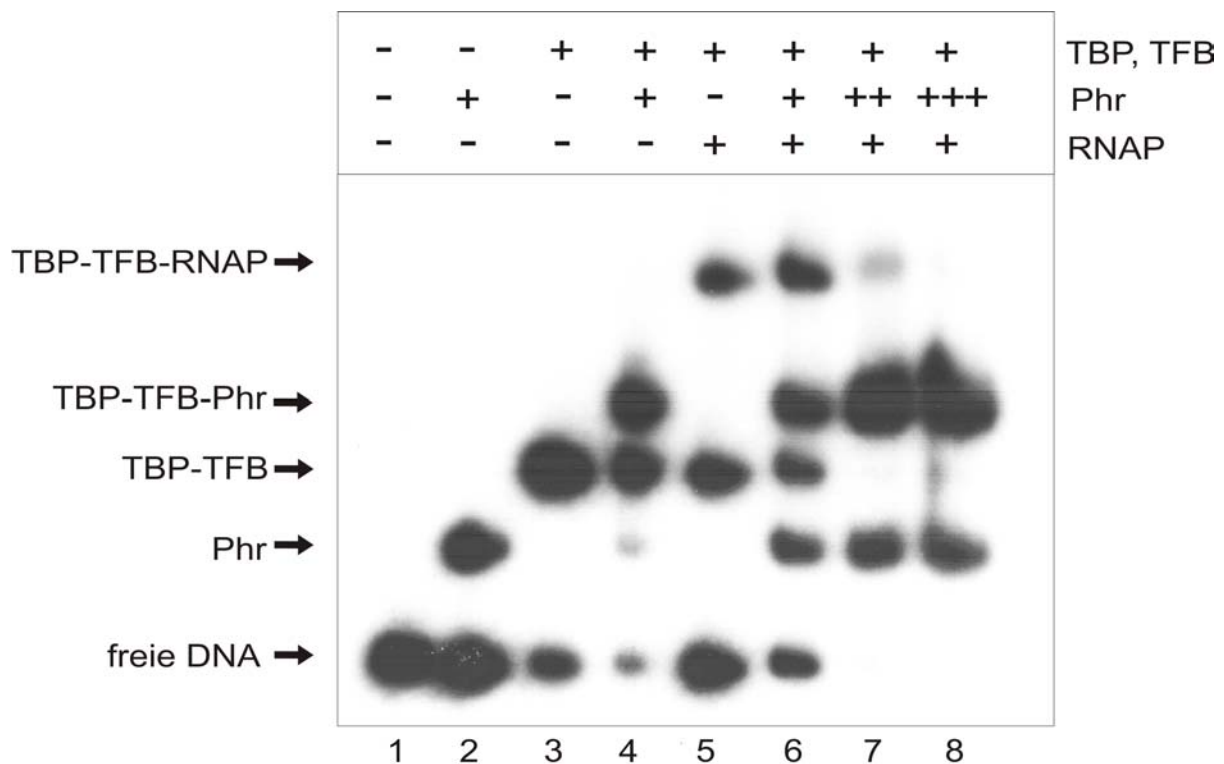
Der Regulator Phr hemmt die Transkription an mindestens drei Hitzeschockgenen. Um die Interaktionen dieses Regulators mit dem Promotor und den Transkriptionsfaktoren eingehender zu untersuchen, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Dabei wurde zunächst der *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor verwendet, da an diesem die Transkription durch Phr am effektivsten gehemmt wird.

##### **4.1 Phr bindet an den *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor und verhindert die Anlagerung der RNA-Polymerase**

Die radioaktiv markierte Promotorregion des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens von Position -95 bis +225 wurde in einer Bindereaktion zusammen mit dem Regulator Phr und bzw. oder den archaeellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB sowie mit der RNA-Polymerase inkubiert und die DNA-Protein-Komplexe auf einem nativen PA-Gel analysiert.

Die Analyse der DNA-Komplexe zeigt, dass Phr an die markierte Promotorregion des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens binden kann, der Einsatz von Phr verursacht eine Verschiebung (shift) der DNA-Bande (Abb. 8, Spur 2). Die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB binden ebenfalls an den untersuchten Promotor, erkennbar an dem Komplex in Spur 3 der Abbildung 8. Phr ist in der Lage, zusammen mit den beiden Transkriptionsfaktoren TBP und TFB an diesen Promotor zu binden, was in Spur 4 der Abbildung 8 erkennbar ist. In diesem Ansatz wurden TBP, TFB und Phr eingesetzt. Es entsteht neben dem durch TBP/TFB und dem durch Phr entstandenen Komplexen ein weiterer, im Laufverhalten noch stärker verzögerter (retardierter) Komplex, der durch die gemeinsame Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren und Phr verursacht wird. Die Existenz dieses TBP/TFB-Phr-DNA-Komplexes beweist, dass diese drei Proteine gleichzeitig an den *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor binden können. In Spur 5 der Abbildung 8 wurden zu dem Versuchsansatz TBP, TFB und RNA-Polymerase hinzugegeben. Es entsteht

ein Komplex mit geringer elektrophoretischer Beweglichkeit, bestehend aus TBP/TFB-RNA-Polymerase und DNA. Werden diesem Ansatz steigende Mengen an Phr zugefügt (Spur 6 bis 8), so bildet sich deutlich der TBP/TFB-Phr-DNA-Komplex aus, und der TBP/TFB-RNA-Polymerase-DNA-Komplex verschwindet. Daraus kann man folgern, dass Phr die Anlagerung der RNA-Polymerase an den TBP/TFB-Promotorkomplex verhindert.

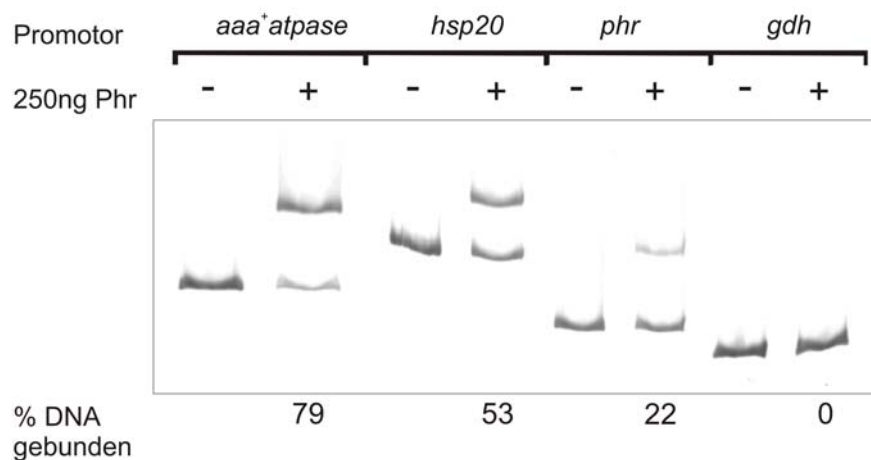


**Abb. 8: Phr bindet spezifisch an den *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor und verhindert die RNA-Polymerase-Anlagerung.** Gelretardationsexperiment mit dem radioaktiv markierten Promotor des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens und verschiedenen Mengen Proteinen. Es wurden 0.23µM TBP, 0.13 µM TFB 0,008µM RNAP und 0.74 (+), 1.9 (++) oder 3.7µM (+++) Phr eingesetzt, wie über den Spuren angegeben. Die freie DNA und die jeweiligen DNA-Protein-Komplexe sind links neben dem Autoradiogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

## 4.2 Bindung von Phr an weitere Promotoren

Da Phr neben der Transkription am *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor auch die Transkription am *hsp20*- und am *phr*-Promotor hemmt, muss Phr auch diese Promotoren binden. Um das zu zeigen, wurden weitere EMSAs durchgeführt. Es wurden fluoreszenz-markierte Matrizen, die die Promotorsequenzen enthielten, und 250 ng Phr eingesetzt (siehe II 8.2).

Abbildung 9 zeigt die Bindung von Phr am *aaa<sup>+</sup>atpase*-, *hsp20*- und *phr*-Promotor. Beim Einsatz identischer Mengen DNA-Matrize und Phr zeigt sich, dass der *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor, der schon bei den *in vitro*-Transkriptionsversuchen am stärksten von Phr beeinflusst wurde, auch am effektivsten von Phr gebunden wird. 79% der eingesetzten DNA findet sich im DNA-Phr-Komplex wieder. Am zweitstärksten bindet Phr an den *hsp20*-Promotor, bei dem 53% der eingesetzten DNA gebunden werden. Auch der Promotor des *phr*-Gens wird von Phr gebunden. Hier gehen aber nur 22% der DNA in den Phr-DNA-Komplex über. Die Matrize mit dem *gdh*-Promotor dient als Kontrolle. Diese Sequenz wird nicht von Phr gebunden.



**Abb. 9: Phr bindet spezifisch an die Promotoren verschiedener Hitzeschockgene.** Gelretardationsexperiment mit fluoreszenz-markierten Promotoren der Gene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20*, *phr* und *gdh*. Die Zugabe von 250ng Phr ist über den Spuren mit einem + gekennzeichnet. Die Quantifizierung der gebundenen DNA erfolgte mit einem Phosphorimager.

## 5. Identifizierung der Bindestelle von Phr am *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor durch DNaseI-Footprinting

Zur Identifizierung der genauen Bindestelle von Phr am *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor wurden DNaseI-Footprinting-Experimente durchgeführt. Der radioaktiv markierte Promotor des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens wurde in einer Bindereaktion mit den Transkriptionsfaktoren TBP und TFB und/oder mit Phr inkubiert (s. II 10). Nach DNaseI-Hydrolyse und Trennung auf einem Sequenzgel konnten DNA-Bereiche, die durch gebundene Proteine geschützt waren, identifiziert werden.

Abbildung 10 A zeigt das Ergebnis dieser Schutzexperimente am codierenden Strang, Abbildung 10 B das Ergebnis am codogenen Strang. In Spur 1 und 2 ist jeweils die hydrolysierte DNA aufgetragen, die nicht zuvor mit Proteinen inkubiert wurde. Die mit Phr inkubierte DNA ist in den Spuren 3 und 4 aufgetragen. Hier ist deutlich ein vor dem DNaseI-Abbau geschützter Bereich zu erkennen. Auf dem codierenden Strang wird die DNA von Position -15 bis +14 durch Phr geschützt. Auf dem codogenen Strang liegt der durch Phr geschützte Bereich zwischen Position -17 und +12. Die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB zusammen verursachen einen Footprint, der sich auf dem codierenden Strang von Position -17 bis -41 und auf dem codogenen Strang von Position -36 bis -19 erstreckt (vgl. Abb. 10 A und B, Spur 5 und 6). Die Bindestellen von Phr und TBP/TFB auf dem *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor überlappen also nicht.

Bei Inkubation der Matrize mit Phr, TBP und TFB zusammen wird deutlich, dass alle drei Proteine die DNA-Matrize auch gleichzeitig binden können. Der Footprint erstreckt sich auf dem codierenden Strang von -41 bis +14 und auf dem codogenen Strang von -36 bis +12 (vgl. Abb. 10 A und B, Spur 7 und 8).

Auf dem codierenden Strang kann an Position -6 eine hypersensitive Stelle lokalisiert werden, wenn TBP/TFB und Phr gebunden sind (Abb. 10 A, Spur 7 und 8).

In Abbildung 10 C wurden die Footprint-Daten schematisch zusammengefasst. TBP und TFB überlagern bei ihrer gemeinsamen Bindung die TATA-Box der DNA-Matrize. Phr bindet direkt stromabwärts von TBP und TFB im Bereich des Transkriptionsstartpunktes. Damit überdeckt Phr die Region des Hitzeschockpromotors, an die die RNA-Polymerase bei der Initiation der Transkription bindet.

Damit ist der molekulare Mechanismus der beobachteten Transkriptionshemmung der Hitzeschockgene *in vitro* durch Phr geklärt: Bindet Phr an die Promotorregion der Hitzeschockgene, ist die Bindestelle der RNA-Polymerase besetzt, der Präinitiationskomplex kann sich nicht ausbilden und die Transkription der Hitzeschockgene nicht erfolgen.





**Abb. 10: Identifizierung der Phr-Bindestelle am *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor.** DNaseI-Footprint-Analysen von TBP/TFB und Phr (A) am codierenden Strang und (B) am codogenen Strang des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors. Die Zugabe von 200ng (0.93µM) TBP, 200ng (0.55µM) TFB und/oder 1000ng (3.7µM) Phr ist über den Spuren mit einem + vermerkt. Die Positionen der durch TBP/TFB und Phr induzierten Footprints sind rechts neben den Autoradiogrammen gekennzeichnet. Der Stern markiert eine hypersensitive Stelle bei Position -6. Die mit A,T,G und C gekennzeichneten Spuren repräsentieren die Sequenzreaktionen. (C), Zusammenfassung der Footprint-Daten. Über und unter der Promotorsequenz des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens sind durch gelbe Kästen die durch TBP/TFB induzierten Footprints, durch orange Kästen die durch Phr induzierten Footprints gekennzeichnet. Die TATA-Box und der Transkriptionsstart (+1) sind fett gedruckt.

## 6. Analyse der Promotorsequenzen der durch Phr regulierten Gene

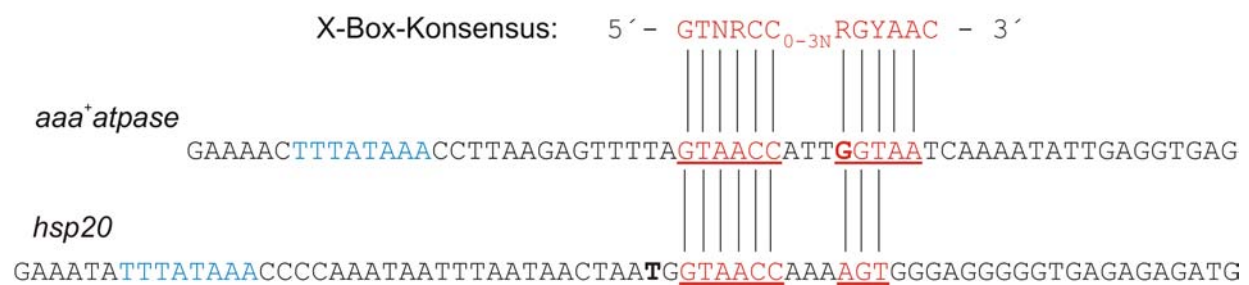
Durch die DNaseI-Footprints wurde der Bereich identifiziert, an den Phr auf dem *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor bindet. Bindeversuche mit Phr und verschiedenen Oligonukleotiden, die entweder aus der Phr-Erkennungssequenz des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors oder leichten Veränderungen dieser Sequenz bestehen, haben drei für die Phr-Bindung essentielle Sequenzelemente aufgezeigt (ENGELMANN, 2002; VIERKE et al., 2003). Das sind die Sequenzen TTTA bei -10, TGGTAA im Bereich des Transkriptionsstarts und AAAA bei +10 (vgl. Abb. 11). Mutationen in diesen Bereichen führen zu keiner bzw. zu einer stark verminderten Bindung von Phr an diese Sequenzen. Dabei sind für eine effektive Phr-Bindung besonders die Sequenzelemente bei -10 und bei +1 von Bedeutung.

Vergleicht man den *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor mit den beiden anderen Hitzeschockpromotoren, die von Phr gebunden werden, fällt auf, dass bei allen drei Promotoren verschiedene Basen dieser drei wichtigen Sequenzbereiche zusammen ein Palindrom bilden (s. Abb. 11). Dieses Palindrom wird als Erkennungssequenz für Phr vorgeschlagen.



**Abb. 11: Die Erkennungssequenz von Phr an den Hitzeschockpromotoren ist ein Palindrom.** Nukleotidsequenzen der Hitzeschockpromotoren *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr*. Die durch Mutationsanalysen ermittelten essentiellen Sequenzen des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors für die Phr-Bindung sind in der oberen Sequenz durch orange und unterstrichene Buchstaben markiert. Das bei allen drei Promotoren vorkommende Palindrom ist in den Sequenzen darunter ebenfalls durch orange und unterstrichene Buchstaben und zusätzlich durch Striche markiert. TATA-Boxen sind blau, die Startnukleotide fett gedruckt.

Beim Vergleich der *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotorsequenz mit verschiedenen bekannten Erkennungssequenzen eukaryotischer Transkriptionsfaktoren fällt auf, dass diese Sequenz der sogenannten X-Box auffällig ähnlich sieht. Die X-Box hat die Konsensussequenz 5'-GTNRCC (0-3N) RGYAAC-3', wobei N ein beliebiges Nukleotid ist, R ein Purin und Y ein Pyrimidin (EMERY et al., 1996 b). Diese unvollständige, umgekehrte Wiederholungssequenz (inverted repeat) findet man fast genauso in der *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotorsequenz wieder (vgl. Abb. 12). Nur das letzte Nukleotid der Konsensussequenz stimmt nicht mit der Sequenz im *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor überein. Auch beim *hsp20*-Promotor kann ein ähnliches Motiv ausgemacht werden, welches aber in den letzten drei Nukleotiden nicht mit der Konsensussequenz der X-Box übereinstimmt. Im Promotorbereich des *phr*-Gens wird dieses Motiv dagegen nicht gefunden.



**Abb. 12: Die Hitzeschockpromotoren *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* haben Ähnlichkeiten mit der eukaryotischen X-Box-Konsensussequenz.** Nukleotidsequenzen der eukaryotischen X-Box-Konsensussequenz und der Hitzeschockpromotoren *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20*. Die bei den Hitzeschockpromotoren vorkommenden Elemente der X-Box sind unterstrichen und so wie die Sequenz der X-Box rot gedruckt. Zusätzlich sind gemeinsam vorkommende Nukleotide durch Strichverbindungen markiert. TATA-Boxen sind blau, die Transkriptionsstartnukleotide fett gedruckt.

Die X-Box ist im eukaryotischen Genom unterschiedlich lokalisiert. Sie kommt zum Beispiel in der Region um -40 relativ zum Transkriptionsstart (LIU et al., 1999), in Intronsequenzen (REINHOLD et al., 1995) oder auch im Bereich des Transkriptionsstartes (SENGUPTA et al., 1999) vor. An die eukaryotische X-Box binden Proteine der sogenannten RFX (regulator factor x)-Familie, die bei allen Gattungen - von der Hefe bis zu den Menschen - vertreten ist. Die RFX-Proteine sind zum Großteil Transkriptionsaktivatoren und besitzen ein winged Helix-DNA-Bindemotiv. Auch Phr ist ein winged Helix-Protein. Sequenzvergleiche zwischen

der Phr-Bindedomäne und verschiedenen RFX-Proteinen zeigten aber keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten.

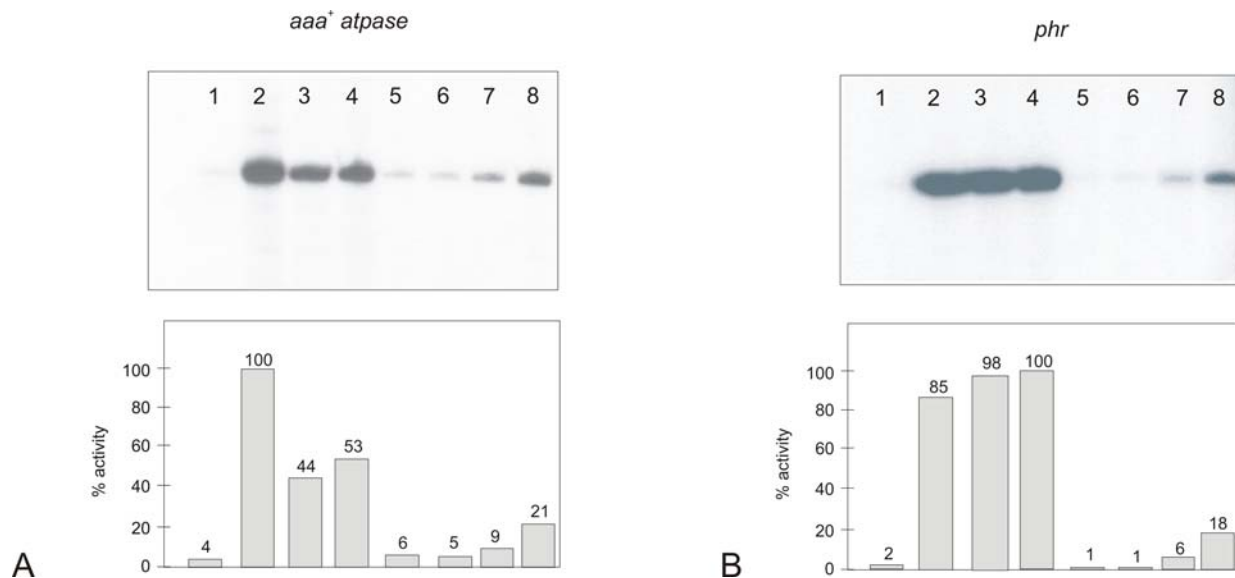
## **7. Untersuchungen zur Phr-Regulation *in vivo***

Um zu zeigen, dass Phr tatsächlich ein Regulator der Hitzeschockantwort ist, wurden *in vivo* Versuche durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die untersuchten Gene auch wirklich Hitzeschockgene sind und ob die Funktion von Phr in Zusammenhang mit einer Hitzeschockregulation steht.

### **7.1 Analyse der mRNA-Menge von Phr und der AAA<sup>+</sup>ATPase bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen**

Für das *hsp20*-Gen aus *Pyrococcus furiosus* wurde schon bei LAKSANALAMAI et al. (2001) gezeigt, dass es unter Hitzeschockbedingungen verstärkt transkribiert wird. Das hier untersuchte *hsp20*-Gen ist damit eindeutig ein Hitzeschockgen. Um dieses auch für die beiden anderen hier untersuchten Gene zu überprüfen, wurde die Transkription des *aaa<sup>+</sup>atpase*- und des *phr*-Gens bei verschiedenen Temperaturen und auch bei verschiedenen Wachstumsphasen untersucht.

Hierzu wurden *Pyrococcus furiosus*-Zellen in einem 100 Liter Fermenter bei 95°C angezogen und einem Hitzeschock von 103°C ausgesetzt. Es wurden Zellproben unmittelbar vor der Temperaturerhöhung sowie 30, 60 und 90 Minuten nach der Temperaturerhöhung entnommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Ebenso wurde die Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden *Pyrococcus furiosus*-Kulturen isoliert und aus Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Jeweils 30 µg der isolierten RNA dienten als Ausgangsmaterial für Primer Extension-Experimente. Mit Hilfe dieser Experimente kann die mRNA-Synthese der untersuchten Gene bei den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen quantitativ dargestellt werden.



**Abb. 13: Hitzeschockbedingungen und der Übergang in die stationäre Wachstumsphase führen zur vermehrten mRNA-Bildung von *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr* in vivo.** Primer Extension-Analysen von je 30µg *P. furiosus*-RNA unterschiedlicher Wachstumsbedingungen. Spur 1: Wachstumstemperatur 95°C, Spuren 2, 3 und 4: Ernte nach einer 30, 60 bzw. 90 minütigen Hitzebehandlung bei 103°C. Spuren 5-8: Wachstumstemperatur 95°C bei einer OD<sub>578</sub> von 0.14, 0.27, 0.60 bzw. 0.58, was der frühen exponentiellen, der späten exponentiellen, der frühen stationären und der späten stationären Wachstumsphase entspricht. (A), Analyse der *aaa<sup>+</sup>atpase* Transkripte, (B), Analyse der *phr*-Transkripte. Die Quantifizierung wurde mit einem Phosphoimager vorgenommen, wobei das stärkste Transkript jeweils gleich 100% gesetzt wurde.

Aus Abbildung 13 wird deutlich, dass die relative mRNA-Menge der AAA<sup>+</sup>ATPase nach einem Hitzeschock drastisch ansteigt. Während aus einer bei 95°C wachsenden *Pyrococcus furiosus*-Kultur kaum *aaa<sup>+</sup>atpase*-mRNA nachzuweisen ist, steigt die mRNA-Menge nach einem Hitzeschock von 30 Minuten bei 103°C um das 25fache an (vgl. Abb. 13 A, Spur 1 und 2). Die mRNA-Menge bleibt auch 60 und 90 Minuten nach der Temperaturerhöhung auf einem hohen Niveau, sie ist noch um das 11- bzw. 13fache gegenüber der Menge aus bei 95°C wachsenden Kulturen erhöht. Auch das *phr*-Gen wird nach einem Hitzeschock verstärkt transkribiert. Nach 30 Minuten Hitzeschock ist die mRNA-Menge um das 42fache höher als in ungeschockten Zellen. Die höchste nachweisbare mRNA-Menge wird nach 90 Minuten Hitzeschock erreicht (Abb. 13 B, Spur 4).

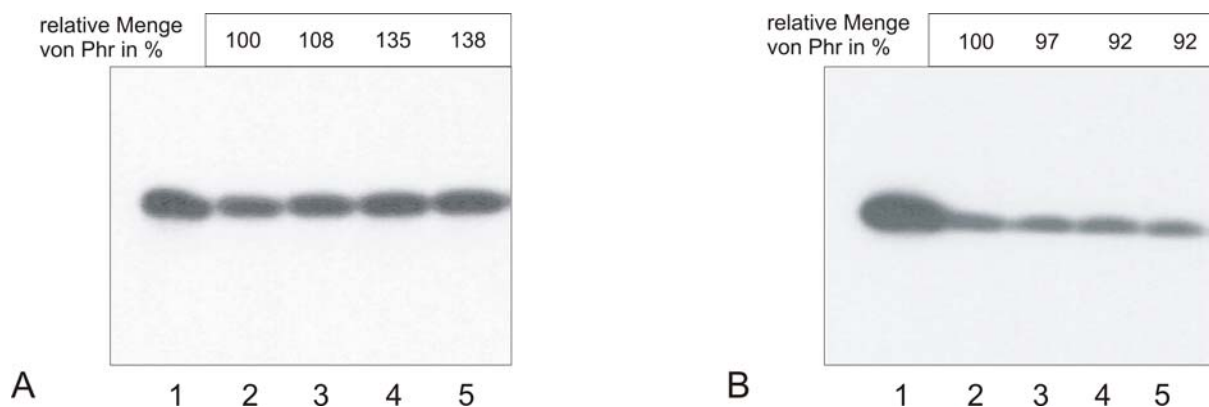
Die Transkription beider Gene, der *aaa<sup>+</sup>atpase* und des *phr*, wird auch während der stationären Wachstumsphase der Zellen gesteigert. Während der frühen und späten exponentiellen Wachstumsphase der *Pyrococcus furiosus*-Kultur ist die mRNA dieser beiden Gene kaum nachweisbar (Abb. 13 A und B, Spuren 5 und 6). Das ändert sich beim Übergang in die frühe und vor allem bei dem weiteren Übergang in die späte stationäre Phase, wo die

Transkriptmenge deutlich zunimmt (Abb. 13 A und B, Spuren 7 und 8). Die Transkription des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens wird in der frühen stationären Phase um den Faktor 1.5 und in der späten stationären Phase um den Faktor 3.5 stimuliert, die des *phr*-Gens um die Faktoren 6 bzw. 18.

Die Gene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr* werden also ebenfalls wie *hsp20* unter Stressbedingungen verstärkt exprimiert und sind so eindeutig als Hitzeschockgene zu bezeichnen.

## 7.2 Analyse der Proteinmenge von Phr bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

Phr wird unter Hitzeschock verstärkt transkribiert. Ob auch das Protein unter diesen Bedingungen verstärkt gebildet wird, wurde mit Western Blot-Experimenten untersucht. *Pyrococcus furiosus* wurde im Fermenter angezogen und bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen geerntet. Es wurden Zellen vor einer Hizeschockbehandlung sowie 30, 60 und 90 min nach einem Hitzeschock bei 103°C entnommen. Des Weiteren wurden Kulturen in der frühen exponentiellen, späten exponentiellen, frühen stationären sowie späten stationären Wachstumsphase geerntet. Jeweils 20 µg Zellextrakt dieser Kulturen wurden in Western Blot-Experimenten analysiert.



**Abb. 14: Die Protein-Menge von Phr steigt nach einem Hitzeschock leicht an, bei dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase ist ein Proteinanstieg nicht nachweisbar.** Western Blot-Analysen von 20µg *P. furiosus*-Zellextrakt (A) unter dem Einfluss eines Hitzeschocks, Spur 1: 20µg rekombinantes Phr, Spur 2: Zellextrakt nach Wachstum bei 95°C, Spuren 3-5: nach 30, 60 bzw. 90 Minuten nach Hitzebehandlung bei 103°C. (B) bei verschiedenen Wachstumsphasen, Spur 1: 20µg rekombinantes Phr, Spuren 2-5: nicht gestresste Kultur, geerntet bei einer OD<sub>578</sub> von 0.14, 0.27, 0.60 bzw. 0.58, was der frühen exponentiellen, der späten exponentiellen, der frühen stationären und der späten stationären Wachstumsphase entspricht. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit einem Phosphorimager.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse. In Abbildung 14 A ist die relative Proteinmenge von Phr vor (Spur 2) und 30, 60 bzw. 90 Minuten (Spuren 3, 4, 5) nach einem Hitzeschock dargestellt. Es fällt auf, dass die Phr-Menge nach einem Hitzeschock der *Pyrococcus furiosus*-Zellen nur ganz leicht erhöht ist gegenüber der Menge bei normaler Wachstumstemperatur. In mehreren Kontrollversuchen stieg die Phr-Menge im Mittel nach 90 Minuten Hitzeschock lediglich um den Faktor 1,4 an.

Innerhalb der verschiedenen Wachstumsphasen ist kein signifikanter Unterschied in der Phr-Expression auszumachen (vgl. Abb.14 B).

Im Gegensatz zur *aaa<sup>+</sup>atpase*- und zur *phr*-mRNA ist das Protein Phr auch bei 95°C, das heißt in nicht gestressten *Pyrococcus furiosus*-Zellen, nachweisbar.

Phr wird also sowohl in nicht gestressten als auch in gestressten Zellen exprimiert und benötigt.

### 7.3 Phr-Bindung *in vivo*

Es wurde gezeigt, dass Phr *in vitro* an die Promotorsequenzen von mehreren Hitzeschockgenen bindet. Weiterhin konnte der Mechanismus der Transkriptionshemmung dieser Hitzeschockgene durch Phr nachgewiesen werden. Ob und unter welchen Bedingungen diese Hitzeschockregulation in den lebenden *Pyrococcus furiosus*-Zellen stattfindet, wurde anhand von Formaldehyd *in vivo* Crosslinking-Versuchen analysiert. Einerseits wurde die *in vivo*-Bindung von Phr an die bekannten Promotorsequenzen der Hitzeschockgene untersucht (Abschnitt 7.3.1), andererseits wurde genomweit nach weiteren Phr-Bindesequenzen gesucht (Abschnitt 7.3.2).

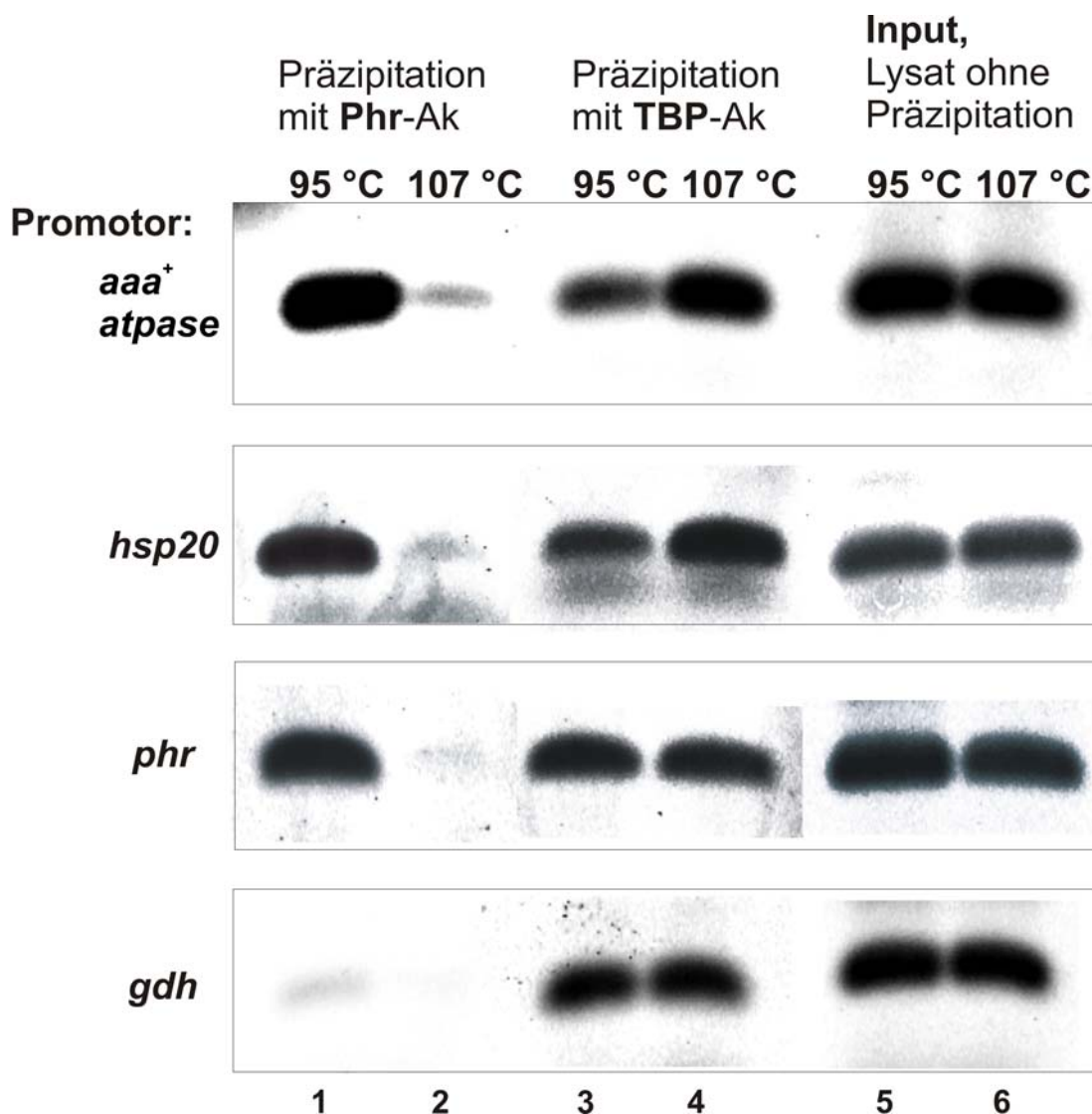
#### 7.3.1 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

In der logarithmischen Phase wachsende *Pyrococcus furiosus*-Zellen wurden durch Zugabe von 0,1% Formaldehyd entweder bei 95°C oder bei 107°C fixiert, was zur kovalenten Vernetzung aller Protein-Protein- und Protein-DNA-Komplexe führte. Nach Scherung der DNA durch Ultraschallbehandlung, Coimmunpräzipitation der an Phr gebundenen DNA durch Phr-Antikörper, Umkehr der Quervernetzung und Reinigung der DNA (s. II 12.1) aus diesem Ansatz wurde das sogenannte Präzipitat gewonnen. Das Präzipitat besteht demnach aus der DNA, die zum Zeitpunkt der Fixierung der *Pyrococcus*-Zellen an Phr gebunden war. Durch PCR mit dem Präzipitat als Matrize und Primern, die die zu untersuchende Sequenz



flankierten, war es möglich, spezifische DNA-Sequenzen als Phr-Bindestellen *in vivo* zu identifizieren. Als Kontrolle diente Präzipitat, welches durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper gegen TBP hergestellt wurde. Des Weiteren wurde eine Kontrolle mitgeführt, die aus der fixierten DNA ohne anschließende Immunpräzipitation hervorging, welche im Folgenden als Input bezeichnet wird.

Die Präzipitate wurden in PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein der Promotorsequenzen des *aaa<sup>+</sup>atpase*-, des *hsp20*-, des *phr*- und des *gdh*-Gens getestet. Eine positive PCR bedeutete, dass die amplifizierte Sequenz bei der Immunpräzipitation copräzipitiert wurde. Diese Sequenz war also zum Fixierungszeitpunkt von dem entsprechenden Protein gebunden.



**Abb. 15: Phr bindet die Hitzeschockpromotoren *in vivo* bei 95°C, bei 107°C dagegen nicht mehr.** ChIP-Experiment mit bei 95°C und bei 107°C fixierten *P. furiosus* Kulturen. Die Immunpräzipitation erfolgte entweder mit Phr- oder als Kontrolle mit TBP-Antikörpern. Jeweils ca. 130 pg der coimmunpräzipitierten DNA sowie der Input-Kontrollen wurden in PCR-Reaktionen auf die Promotoren *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20*, *phr* und *gdh* getestet. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel mit dem Phosphorimager.



Bei Immunpräzipitation mit Anti-Phr nach einer Fixierung bei 95°C sind die Promotoren *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* nachweisbar (s. Abb. 15, Spur 1). Phr bindet also *in vivo* bei 95°C die Promotoren dieser drei Hitzeschockgene. An den *gdh*-Promotor bindet Phr nicht, diese PCR ist negativ.

Bei Präzipitaten, die durch Immunpräzipitation mit Anti-TBP hervorgegangen sind, sind sowohl die drei Hitzeschockpromotoren als auch der *gdh*-Promotor nachweisbar (Spur 3), denn TBP bindet als Transkriptionsfaktor alle bekannten Promotoren. Ebenso wie die Präzipitation mit Anti-TBP dient auch das Lysat ohne Präzipitation (= Input) als Positivkontrolle. Hier wird keine DNA durch Präzipitation angereichert, und es sind alle untersuchten Sequenzen sowohl bei 95°C als auch bei 107°C nachweisbar.

Unter Hitzeschockbedingungen ändert sich die Phr-Bindung *in vivo*. Während bei 95°C eine deutliche Bindung von Phr an die Hitzeschockpromotoren nachzuweisen ist, ist der Nachweis aus bei 107°C hitzegeschockten Zellen negativ (Spur 2). Phr muss also beim Übergang von Nicht-Hitzeschockbedingungen zu Hitzeschockbedingungen von den Hitzeschockpromotoren abfallen. Der Kontrollversuch mit TBP-Antikörpern zeigt, dass TBP bei 107°C noch an die untersuchten Promotoren bindet (Spur 4). Bei dem *aaa<sup>+</sup>atpase*- und dem *hsp20*-Promotor scheint die TBP-Bindung unter Hitzeschock sogar noch stärker zu sein als bei 95°C (vergleiche Abb. 15, Spur 3 und 4).

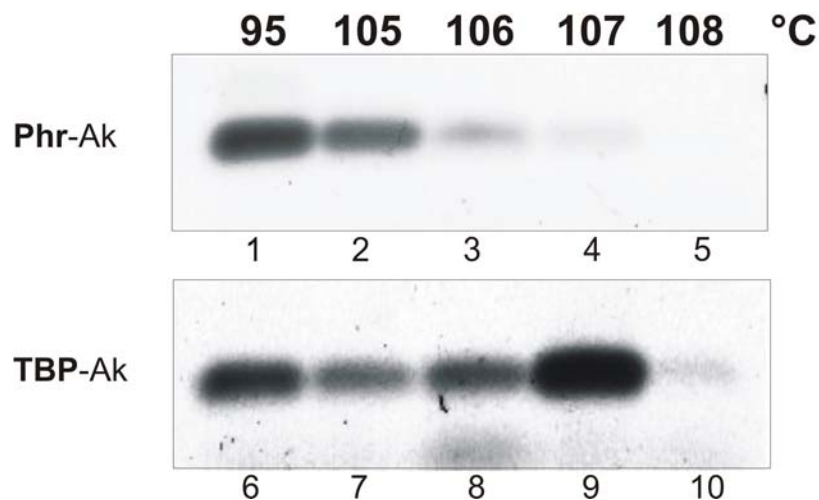
Phr bindet also auch *in vivo* die Promotoren der drei untersuchten Hitzeschockgene. Diese Bindung findet unter normalen Wachstumsbedingungen, das heißt bei 95°C, statt. Werden die Zellen einem Hitzeschock von 107°C ausgesetzt, kann Phr nicht mehr binden. Phr dissoziiert von den Hitzeschockpromotoren und ermöglicht so die Transkription der Hitzeschockgene als Reaktion auf einen Hitzeschock.

In vorherigen Versuchen (Versuch 7.1 und 7.2) wurden Temperaturen von 103°C als Hitzeschockbedingungen für *Pyrococcus furiosus* definiert. Andere Hitzeschock-Analysen bei *P. furiosus* wurden bei 105°C durchgeführt (LAKSANALAMAI et al., 2001). Hier wurde die Temperatur von 107°C gewählt, weil dabei der Effekt am deutlichsten war.

In Abbildung 16 wurden Präzipitate untersucht, die durch Fixierung der *Pyrococcus*-Zellen bei 95, 105, 106, 107 bzw. 108°C hergestellt wurden. Während bei 95°C und Immunpräzipitation mit Anti-Phr ein starkes PCR-Signal bei der Amplifikation des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors zu sehen ist (Spur 1), nimmt dieses Signal bei steigenden Temperaturen langsam in seiner Intensität ab (Spuren 2 bis 5). Bei Hitzeschockbedingungen von 108°C ist gar keine Bindung mehr von Phr am Hitzeschockpromotor nachweisbar (Spur

5), aber auch TBP ist unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage, den Promotor zu binden (Spur 10).

Bei 107°C ist, wie oben erwähnt, der deutlichste Effekt zu erkennen: Phr bindet den Hitzeschockpromotor nicht mehr, während TBP dagegen den Hitzeschockpromotor unter diesen Bedingungen stärker bindet als bei normalen Wachstumsbedingungen.



**Abb. 16: Bei steigenden Temperaturen verliert Phr seine Affinität zum *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor.** ChIP-Experiment mit bei 95, 106, 107 und 108°C fixierten *P. furiosus*-Kulturen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Phr-Antikörpern (oberer Teil der Abbildung) oder als Kontrolle mit TBP-Antikörpern (unterer Teil der Abbildung). Jeweils ca. 130 pg der coimmunpräzipitierten DNA wurden in PCR-Reaktionen auf die Sequenz des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors getestet. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel mit dem Phosphorimager.

Bei den *in vivo*-Untersuchungen zur Hitzeschockregulation ist es wichtig, dass die Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass die *Pyrococcus*-Zellen zwar einem Hitzeschock ausgesetzt sind, nicht aber einer tödlichen Temperaturerhöhung. Aus diesem Grund wurde vor der Formaldehydfixierung unter Hitzeschockbedingungen eine Lebendkeimzahlbestimmung der *Pyrococcus*-Zellen vorgenommen.

*Pyrococcus*-Zellen, die einem 30minütigen Hitzeschock von 107°C ausgesetzt waren, wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  angeimpft und über Nacht bei 95°C bebrütet. Bis zu einer Verdünnung von  $10^{-8}$  war noch ein Zellwachstum nachweisbar. Die Lebendzellzahl war also, genauso wie bei einer *Pyrococcus*-Kultur, die keinem Hitzeschock ausgesetzt war, größer als  $1 \cdot 10^8$  Zellen pro ml Medium. Das heißt, die *Pyrococcus*-Zellen wurden durch die Hitzebehandlung nicht abgetötet.

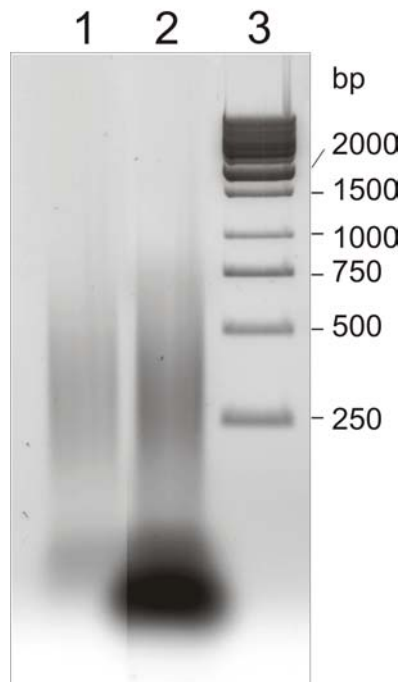
### 7.3.2 ChIP to chip-Analysen

Im vorherigen Abschnitt (7.3.1) wurde nachgewiesen, dass Phr *in vivo* bei 95°C die bekannten Promotorsequenzen der Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* bindet. Durch eine Kombination der Methode der Chromatin*i*mmunpräzipitation (ChIP) mit der DNA-Microarray (= „chip“)-Technik wird es möglich, das gesamte *Pyrococcus furiosus*-Genom auf Phr-Bindestellen hin zu untersuchen. Diese sogenannten ChIP to chip-Analysen erlauben also genomweite *in vivo*-Untersuchungen. Weitere bisher unbekannte Zielgene von Phr sollen identifiziert und so das Verständnis der regulatorischen Funktion von Phr weiter aufgeklärt werden.

Die ChIP to chip-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Michael Adams aus Georgia durchgeführt.

Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche war durch Coimmunpräzipitation mit Anti-Phr angereicherte DNA sowie die nicht angereicherte Kontroll (Input)-DNA (siehe Abschnitt II 12.1). Diese DNA wurde zunächst auf stumpfe DNA-Enden hin verlängert und dann an allen Enden mit Linkern versehen (vgl. II 12.3.1-3). In einer Linker-vermittelten PCR, das heißt einer PCR mit Primern komplementär zu den Linkern an den DNA-Enden, wurde die Gesamt-DNA in den Ansätzen amplifiziert. Die durch Immunpräzipitation mit Phr-Antikörpern angereicherte DNA wurde dabei durch den Einsatz von Cy5-dUTP markiert. Die unangereicherte Kontroll-DNA wurde entsprechend mit Cy3 markiert.

Die DNA in den Ansätzen sollte nach der Amplifikation im Mittel eine Fragmentgröße von 200 bis 600 Basenpaaren haben. Diese wurde durch Agarosegelelektrophorese der Proben überprüft.



**Abb. 17: Die DNA-Fragmente haben nach der linkervermittelten PCR eine Größe von 200-600 bp.** 1.5%iges Agarosegel mit je 5 µl PCR-Produkt der linkervermittelten PCR. Spur 1: durch Anti-Phr angereicherte DNA, Spur 2: nicht angereicherte Kontroll-DNA, Spur 3: DNA-Größenstandard. Die Fragmentgrößen der Banden des DNA-Standards sind rechts angegeben.

Abbildung 17 zeigt die markierte DNA nach der linkervermittelten PCR. In Spur 1 ist die durch Anti-Phr angereicherte DNA aufgetragen, in Spur 2 die Input-DNA. Wie an dem DNA-Standard in Spur 3 abzulesen ist, liegt die Größe der DNA-Fragmente wie erwünscht in einem Bereich von etwa 200 bis 600 Basenpaaren. Damit hat die amplifizierte DNA eine für den Einsatz in die Microarray-Analysen geeignete Länge.

Durch photospektrometrische Analysen (siehe II 12.3.3) wurde die DNA-Menge und der Anteil der eingebauten Cy-Farbstoffe in den PCR-Produkten bestimmt.

Für die angereicherte DNA ergab sich eine Gesamtmenge von 3228 ng. Es wurden 99 pmol Cy5 eingebaut. Die Menge der nicht angereicherten Input-DNA betrug 3028 ng mit 47 pmol eingebautem Cy3. Dieses sind für die Microarray-Analysen ausreichende Mengen. Die spezifisch angereicherte DNA und die nicht angereicherte DNA wurden in einer Menge von jeweils 20 pmol Cy-Farbstoffen zusammengegeben und gefällt.

Die weiteren Schritte erfolgten bei unseren Kooperationspartnern in Georgia (Prof. M. Adams).

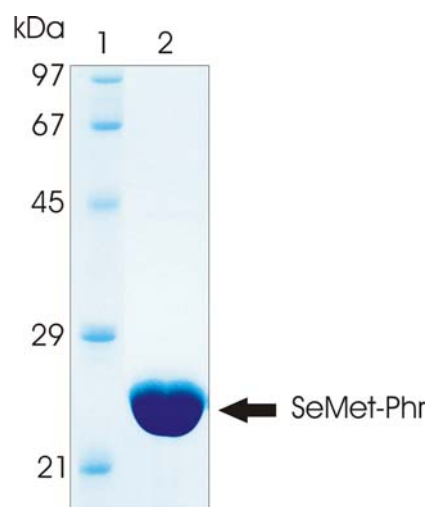
## 8. Herstellung von Phr-Varianten zur Struktur- und Funktionsaufklärung

Für den archaeellen Hitzeschockregulator Phr finden sich bei Bacteria und Eukarya keine Homologe. Lediglich das winged Helix-Turn-Helix-Motiv des Proteins stellt einen konservierten Bereich dar. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur dieses neuartigen Regulators soll zum detaillierteren Verständnis von Phr auf molekularer Basis führen. Dabei ist die Kristallstruktur des Proteins alleine sowie die Struktur des Protein-DNA-Komplexes von Interesse.

### 8.1 Selenomethionin-Derivat von Phr

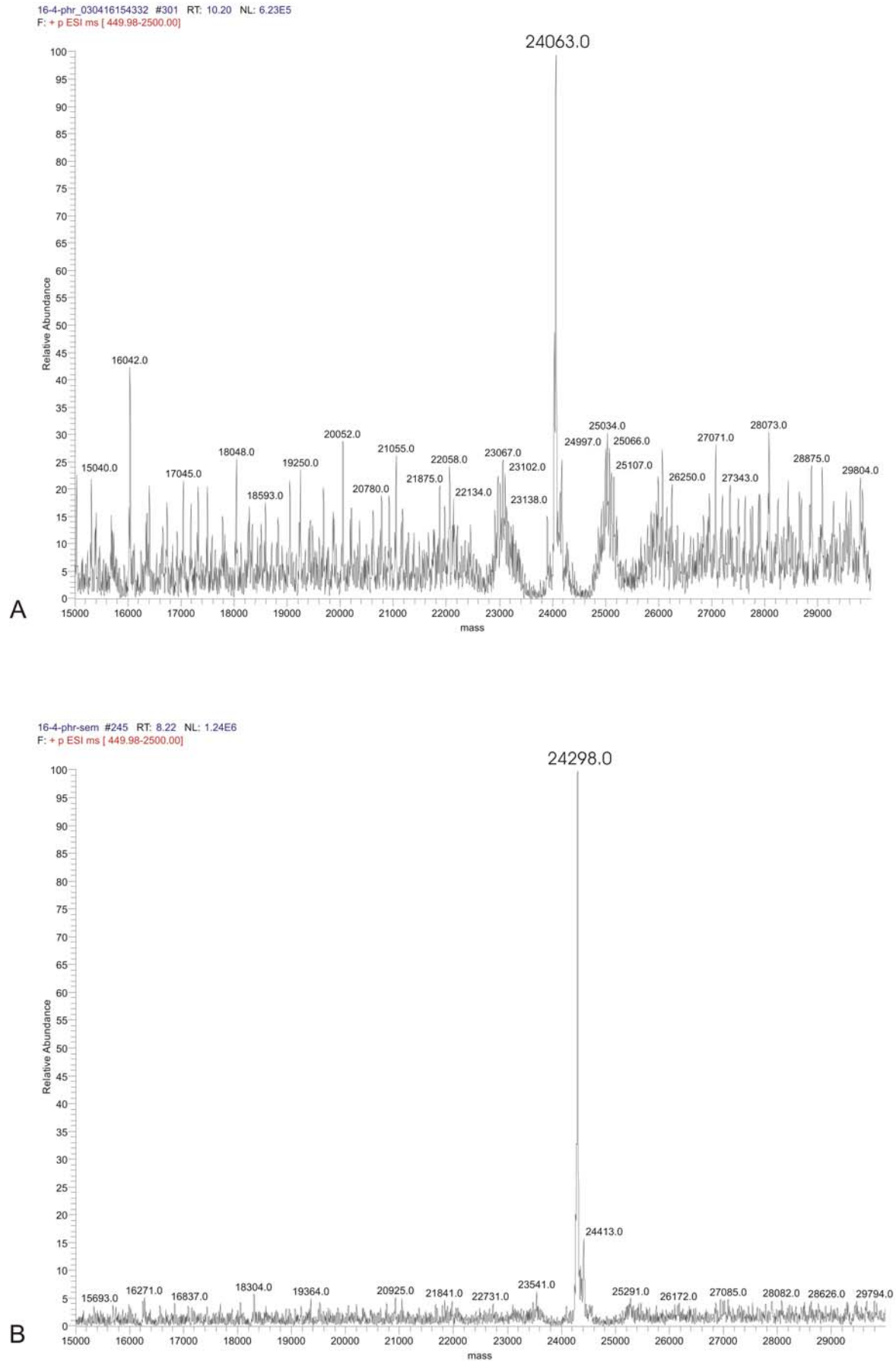
Da aufgrund fehlender Strukturen homologer Proteine die Methode des molekularen Ersatzes (engl.: „molecular replacement“; ROSSMANN und BLOW, 1962) im Falle von Phr zur Strukturaufklärung nicht angewendet werden konnte, wurde die Methode der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (engl.: „multiwavelength anomalous dispersion“ MAD; HENDRICKSON, 1991) verwendet. Diese Methode zur Strukturaufklärung basiert auf Messungen der Röntgenstrahlenabsorption durch spezifische Atome bei spezifischen Wellenlängen. Die Koordinaten der eingesetzten Schweratome stellen dabei ein Anfangsmodell für die Strukturbestimmung dar.

Um diese Methode zu nutzen, wurde rekombinantes Phr hergestellt, bei dem die fünfmal vorkommende Aminosäure Methionin durch Selenomethionin ausgetauscht wurde (vgl. II 13.1). Abbildung 18 zeigt das nach Affinitätschromatographie sehr rein vorliegende SeMet-Phr.



**Abb. 18: Reinigung des Selenomethioninderivats von Phr.** 12%iges SDS-Gel, mit Coomassie gefärbt. Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: gereinigtes SeMet-Phr. Die Größen des Proteinstandards sind auf der linken Seite angegeben. Die Bande des SeMet-Phr ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Das gereinigte SeMet-Phr wurde massenspektrometrisch analysiert (Prof. Deutzmann, Regensburg), um sicherzustellen, dass alle fünf Methioninreste durch Selenomethionin substituiert wurden. Das erwartete Molekulargewicht von Phr ohne Selen beträgt 24034 Da. Das Molekulargewicht von SeMet-Phr, bei dem der Schwefelrest des Methionins durch Selen ersetzt wurde, sollte aufgrund des knapp zweieinhalbmals höheren Molekulargewichts von Selen gegenüber Schwefel 24268 Da betragen. Die Differenz im Molekulargewicht der beiden Proteine beträgt also in etwa 234 Da. Es wurden Massenspektren des unsubstituierten Phr und des SeMet-Phr aufgenommen und verglichen. Abbildung 19 A zeigt das Massenspektrum von unsubstituiertem Phr. Der Peak bei 24063 Da repräsentiert das Molekulargewicht von Phr. SeMet-Phr erzeugt im Massenspektrum (Abb. 19 B) einen Peak bei 24298 Da. Damit liegt der Massenunterschied dieser beiden Proteine bei 235 Da, was den erwarteten 234 Da sehr nahe kommt. Es wurde also ein Proteinderivat hergestellt, bei dem alle fünf Methioninreste durch Selenomethionin ersetzt wurden. Dieses SeMet-Phr war für Kristallisationsversuche und anschließende Strukturauflösung mittels MAD geeignet und verhalf so zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des archaeellen Hitzeschockregulators Phr (LIU et al., Proteindatenbank: 1XNP). Bei Phr handelt es sich um ein neuartiges DNA-Bindeprotein mit einer winged Helix-Turn-Helix-Domäne, bestehend aus vier Helices am N-Terminus (siehe Abb. 20). Im zentralen Teil des Phr-Dimers bilden sich ein antiparalleles Zwei-Helix-Bündel und ein heterogenes  $\beta$ -Faltblatt aus. Den C-Terminus dominiert eine auffällig lange, stark negativ geladene  $\alpha$ -Helix.



**Abb. 19: Im SeMet-Phr sind alle fünf Methioninreste durch Selenomethionin substituiert.** Massenspektren von (A) Phr und (B) SeMet-Phr. Die Phr und SeMet-Phr zugehörigen Peaks sind durch eine große Beschriftung der Masse gekennzeichnet.

## 8.2 Verkürzte Variante von Phr (Phr<sub>AS 1-96</sub>)

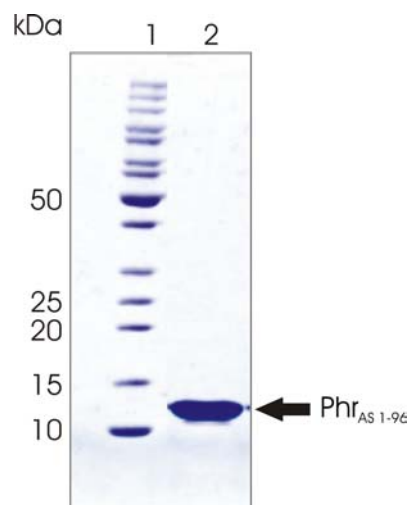
Erkenntnisse über den genauen Mechanismus der DNA-Bindung von Phr sollten durch eine Kristallisation von Phr, gebunden an die DNA, gewonnen werden. Da erste Cokristallisationsversuche aber nicht erfolgreich waren, wurde ein neuer Ansatz verfolgt. Es wurde vermutet, dass sich möglicherweise die  $\alpha$ -Helix am C-Terminus von Phr störend auf die Cokristallisation auswirken könnte. Daher wurde ein am C-Terminus um 106 Aminosäuren verkürztes Phr synthetisiert. Diesem Protein (Phr<sub>AS 1-96</sub>) fehlt damit die lange, stark negativ geladene C-terminale  $\alpha$ -Helix. Phr<sub>AS 1-96</sub> besteht fast ausschließlich aus dem winged Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv. In Abbildung 20 sind die Aminosäuresequenzen von Phr und dem verkürzten Phr dargestellt. Die in der Phr-Struktur vorhandenen Helices konnten aufgrund der Kenntnis der Kristallstruktur in die Sequenzen eingetragen werden.



**Abb. 20: Phr<sub>AS 1-96</sub> besteht fast ausschließlich aus dem Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv.** Aminosäuresequenzen von (A) Phr und (B) Phr<sub>AS 1-96</sub>. Die Helices des Helix-Turn-Helix-Motivs sind durch Beschriftung und graue Kästen gekennzeichnet. Der Bereich der wing-Region ist durch dicke graue Unterstreichung gekennzeichnet. Die Region der langen C-terminalen  $\alpha$ -Helix des vollständigen Proteins ist durch Pfeile markiert.

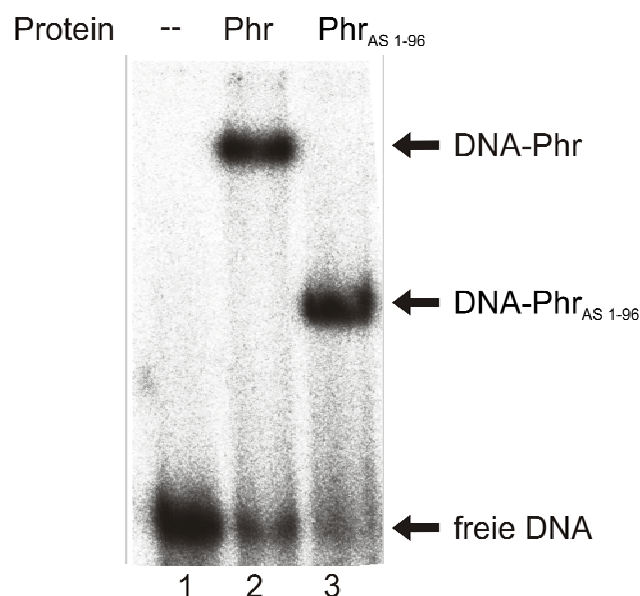


Nach Klonierung und Expression in *E. coli* wurde Phr<sub>AS 1-96</sub> säulenchromatographisch gereinigt. Das gereinigte 11 kDa große Phr<sub>AS 1-96</sub> ist in Abbildung 21 dargestellt.



**Abb. 21: Reinigung des verkürzten Phr.** 8-20% iges SDS-Gradientengel, mit Coomassie gefärbt. Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: gereinigtes Phr<sub>AS 1-96</sub>. Die Größen des Proteinstandards sind auf der linken Seite angegeben. Die Bande des Phr<sub>AS 1-96</sub> ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Voraussetzung für den Einsatz in Cokristallisationsexperimente war die Fähigkeit des Phr<sub>AS 1-96</sub>, spezifisch DNA zu binden. Um dieses nachzuweisen, wurden mit dem Protein und markierten Oligonukleotiden mit der Phr-Erkennungssequenz Bindestudien durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit Phr vollständiger Länge.

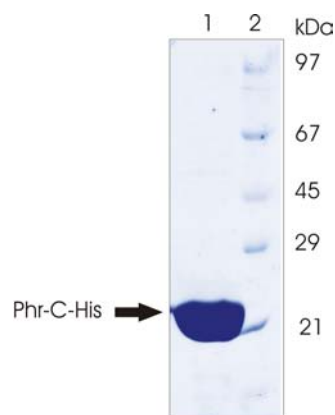


**Abb. 22: Phr<sub>AS 1-96</sub> bindet die Phr-Erkennungssequenz.** Gelretardationsexperiment mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid mit der Phr-Erkennungssequenz und 500ng Phr bzw. Phr<sub>AS 1-96</sub>, wie über den Spuren angegeben. Die freie DNA und die jeweiligen DNA-Protein-Komplexe sind rechts neben dem Autoradiogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

Aus der Abbildung 22 wird ersichtlich, dass Phr<sub>AS 1-96</sub> genauso wie Phr vollständiger Länge dazu in der Lage ist, das Oligonukleotid mit der Phr-Erkennungssequenz spezifisch zu binden. Damit konnte Phr<sub>AS 1-96</sub> in Protein-DNA-Cokristallisationsexperimenten eingesetzt werden (LIU et al., unveröffentlichte Daten).

### 8.3 Phr mit einem C-terminalen His-Tag

Eine weitere Variante von Phr zur näheren Charakterisierung der Protein-DNA-Bindung war ein Phr-Konstrukt mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Dieses Protein wurde kloniert und säulenchromatographisch gereinigt. In Abbildung 23 ist das gereinigte circa 25 kDa große Phr-C-His dargestellt.



**Abb. 23: Reinigung von Phr mit einem C-terminalem His-Tag.** 12% iges SDS-Gel, mit Coomassie gefärbt. Spur 1: gereinigtes Phr-C-His, Spur 2: Proteinstandard. Die Größen des Proteinstandards sind auf der rechten Seite angegeben. Die Bande des Phr-C-His ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Dieses Fusionsprotein konnte nun über den His-Tag an eine Chipmatrix gebunden werden, um es in Oberflächenplasmonresonanz-Versuchen auf seine genauen Bindungseigenschaften hin zu untersuchen (LIU et al., unveröffentlichte Daten).

## IV Diskussion

Mit dem *Pyrococcus* heat shock regulator, Phr, wurde erstmals ein Regulator der archaeellen Hitzeschockantwort identifiziert. Durch die Charakterisierung dieses neuartigen Regulators in der vorliegenden Arbeit wird eine wichtige Grundlage geschaffen, die bisher noch sehr wenig untersuchte Hitzeschockregulation der Archaeen besser zu verstehen.

### 1. Die Funktion des archaeellen Regulators Phr und seiner Homologe bei der Hitzeschockantwort in Archaea

Das 24 kDa Protein Phr aus *Pyrococcus furiosus* und seine Homologe kommen ausschließlich bei einigen Vertretern der Euryarchaeota vor. Bakterielle, eukaryotische und crenarchaeelle Proteine, die Homologien zu Phr aufweisen, existieren nicht. Die einzigen Sequenzähnlichkeiten, die zu bakteriellen und eukaryotischen Proteinen gefunden werden, beziehen sich auf den Bereich des wHTH-DNA-Bindemotivs (siehe IV.2). Die Homologe von Phr in den anderen *Pyrococcus*-Arten, in *M. thermoautotrophicus* und in *A. fulgidus* besitzen die größten Sequenzübereinstimmungen zu Phr (Tab. 1). Auch Proteine anderer Euryarchaeota haben Sequenzähnlichkeiten zu Phr, die aber deutlich geringer sind (Tab.2). Es gibt außerdem Vertreter der Euryarchaeota, bei denen kein Phr-Homolog existiert. In den Gattungen *Methanococcus*, *Methanopyrus* und *Thermoplasma* können keine Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu Phr identifiziert werden. Bei Phr handelt es sich also um einen Regulator, der ausschließlich in Euryarchaeota, jedoch nicht in allen, vorkommt.

Der für Phr kodierende ORF PF1790 und seine engsten Homologe wurden erstmals bei GELFAND et al. (2000) erwähnt und in Zusammenhang mit einer möglichen Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort gebracht. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen prognostizierten die Autoren ein in verschiedenen Euryarchaeota konserviertes Hitzeschock-Regulon bestehend aus einem potentiellen Helix-turn-helix (HTH)-Regulatorprotein (Phr bzw. Homologe von Phr) und den Hitzeschockproteinen AAA<sup>+</sup>ATPase und Hsp20.

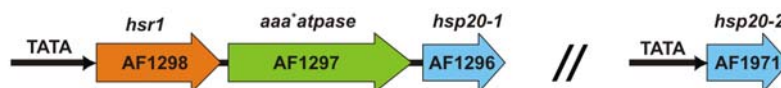
Das Gen für Phr aus *Pyrococcus furiosus* ist im Gegensatz zu seinen engsten Homologen MTH1288 und AF1298 im Genom nicht in direkter Nachbarschaft zu Hitzeschockgenen lokalisiert (Abb. 24). Bei *M. thermoautotrophicus* liegt die Regulatorsequenz (MTH1288) direkt stromaufwärts des *grpE-dnaK-dnaJ*-Operons, wird aber in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Bei *A. fulgidus* ist das Gen für den Regulator AF1298 (*hsrI*) direkt

stromaufwärts der Gene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* lokalisiert, wobei der Abstand dieser Gene jeweils nur 15 Basenpaare beträgt. Die Gene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* von *A. fulgidus* haben keine eigenen TATA-Boxen und Transkriptionsfaktor B-Erkennungselemente, sie liegen offensichtlich mit dem Regulator AF1298 in einem Operon. Die kodierende Sequenz für Phr von *Pyrococcus furiosus* befindet sich dagegen nicht in der Nähe des *aaa<sup>+</sup>atpase*- und des *hsp20*-Gens. Stromaufwärts der *phr*-Sequenz gibt es einen ORF, der für ein Enzym des Energiemetabolismus kodiert. Stromabwärts liegt die Sequenz für ein hypothetisches Protein bisher unbekannter Funktion. Phr ist also im Gegensatz zu seinem Homologen AF1298 aus *A. fulgidus* nicht Bestandteil eines Operons. Allerdings liegen die beiden Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* auch im *P. furiosus*-Genom direkt hintereinander, haben aber im Unterschied zu den entsprechenden Genen aus *A. fulgidus* jeweils eigene TATA-Boxen und Transkriptionsfaktor B-Erkennungselemente.

#### *Methanothermobacter thermoautotrophicus*



#### *Archaeoglobus fulgidus*

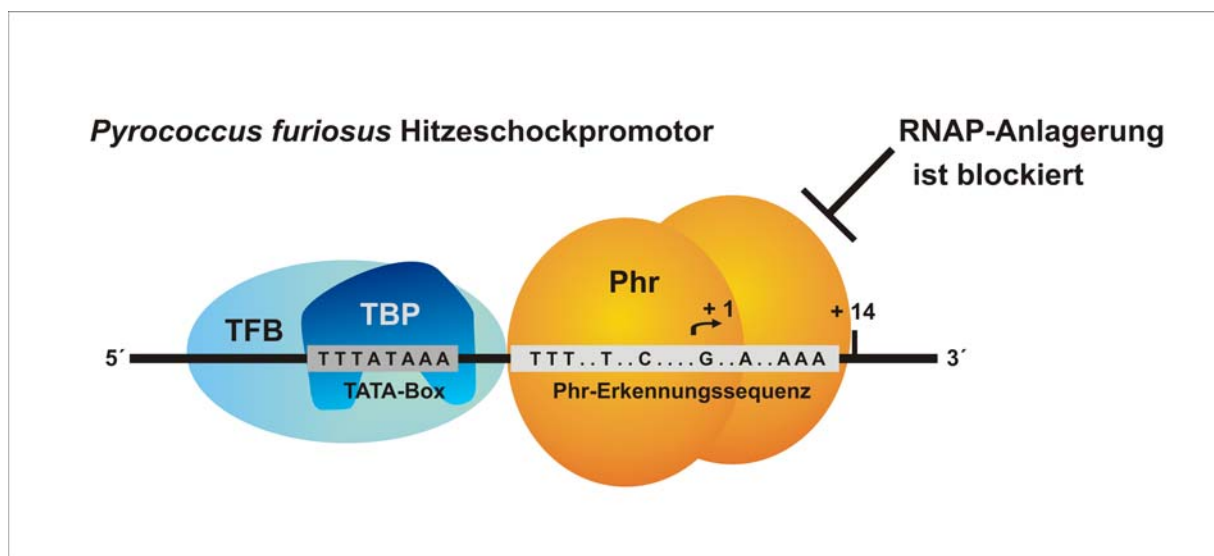


#### *Pyrococcus furiosus*



**Abb. 24: Lokalisierung der kodierenden Sequenzen von Phr und der Phr-Homologe aus *M. thermoautotrophicus* und *A. fulgidus* im Genom.** Die ORFs sind als farbige Pfeile dargestellt, orange: Regulatorsequenz (Phr und Homologe), grün: *aaa<sup>+</sup>atpase*, blau: *hsp20*, gelb: *grpE-dnaK-dnaJ*. Promotoren sind durch die Beschriftung „TATA“ gekennzeichnet. // deutet an, dass sich die folgenden Sequenzbereiche in einem anderen Abschnitt des Genoms befinden.

In dieser Arbeit konnte die Wirkungsweise von Phr durch *in vitro*-Transkriptionsversuche, EMSAs und DNaseI-Footprinting-Analysen aufgeklärt werden. Der Regulator Phr hemmt die Transkription der Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr*, indem er durch Promotorbindung am Transkriptionsstartpunkt die Anlagerung der RNA-Polymerase verhindert. Abbildung 25 zeigt die Wirkungsweise von Phr in einer schematischen Darstellung.



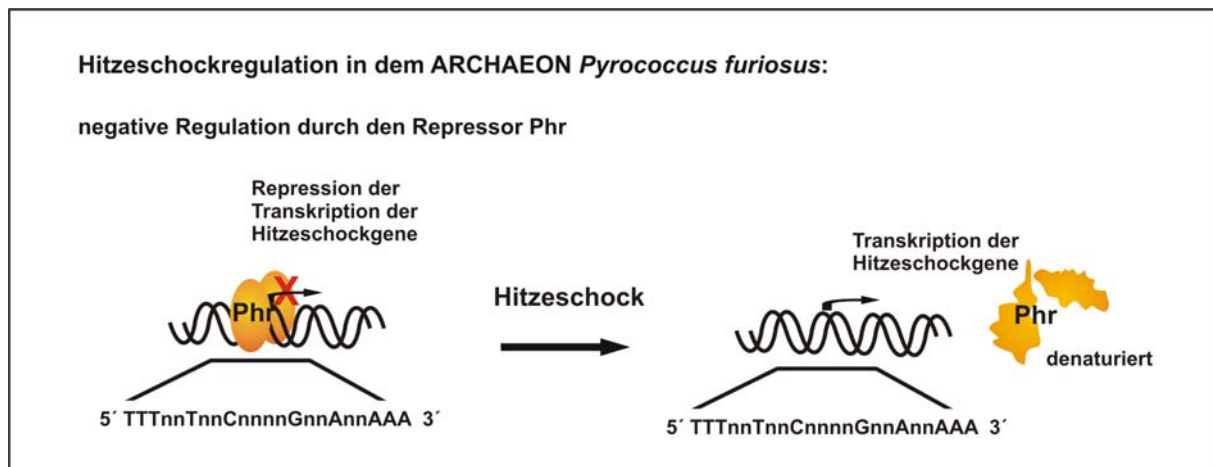
**Abb. 25: Phr bindet den Hitzeschockpromotor am Transkriptionsstart und verhindert dadurch die RNAP-Anlagerung.** Schematische Darstellung des Mechanismus der Transkriptionshemmung durch Phr.

Ein ähnlicher Mechanismus, bei dem ein Regulator an die Transkriptionsstartstelle bindet, kommt sowohl bei der Regulation der Hitzeschockantwort der Bacteria (siehe IV.4) als auch bei der Regulation durch die archaeellen Repressoren MDR1 und LrpA vor. MDR1 aus *Archaeoglobus fulgidus* ist ein metallabhängiger Regulator, der homolog zu den bakteriellen Regulatoren der DtxR-Familie ist. MDR1 bindet seinen Zielpromotor auf die oben beschriebene Weise (BELL et al., 1999). Auch die Transkriptionshemmung, die durch LrpA von *Pyrococcus furiosus* vermittelt wird, beruht auf einer Bindung des Regulators im Bereich des Transkriptionsstartpunktes des Promotors, wobei die Bindung der RNA-Polymerase verhindert wird (BRINKMANN et al., 2000; DAHLKE und THOMM, 2002). Andere archaeelle Regulatoren hemmen dagegen die Ausbildung des TBP/TFB-Komplexes am Promotor. *Sulfolobus solfataricus* Lrs14, welches homolog zu *Pyrococcus furiosus* LrpA ist, bindet den Promotor des Alkoholdehydrogenase-Gens (*adh*) und den seines eigenen Gens,

wobei die Bindung die TATA-Box und das BRE überlappt. Dadurch wird die Ausbildung des ternären Komplexes aus TBP, TFB und DNA verhindert (NAPOLI et al., 1999; BELL und JACKSON, 2000; FIORENTINO et al., 2003).

Um zu überprüfen, ob Phr die Promotoren der drei untersuchten Hitzeschockgene auch *in vivo* bindet, wurde eine Immunpräzipitation von Regulator-DNA-Komplexen durchgeführt (Abb. 3). Diese Methode wurde bei Archaeen erstmals von BELL et al. (1999) angewandt. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Bindung des Repressors MDR1 aus *Archaeoglobus fulgidus* *in vivo* metallabhängig ist. MDR1 bindet seinen Zielpromotor *in vivo* nur in Anwesenheit von Metallionen. Sind nicht genügend Metallionen im Medium verfügbar, bindet MDR1 den Promotor nicht mehr und gibt die Transkription der Gene eines ABC-Transporters frei, wodurch die Bindung und Aufnahme von Metallionen ermöglicht wird.

Die Versuche in dieser Arbeit führten zu dem Nachweis, dass Phr die Hitzeschockpromotoren *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* *in vivo* bindet, und dass die Bindung temperaturabhängig ist (Abb. 15 und 16). Es ergibt sich das in Abbildung 26 dargestellte Modell der archaeellen Hitzeschockregulation durch Phr.



**Abb. 26: Regulation der Hitzeschockantwort in *Pyrococcus furiosus*.** Schematische Darstellung der negativen Regulation durch den Repressor Phr. Die Hitzedenaturierung von Phr führt zu einem Abfall des Proteins vom Hitzeschockpromotor.

Während Phr unter normalen Wachstumsbedingungen die Hitzeschockpromotoren bindet und die Transkription dieser Gene verhindert, ist der Regulator nach Hitzeschock nicht mehr an diese Promotoren gebunden, wodurch als Antwort auf den Hitzeschock die Transkription der Hitzeschockgene ermöglicht wird. Im einfachsten Fall verliert Phr durch eine

temperaturbedingte Denaturierung die Bindungsaffinität zu den Hitzeschockpromotoren. Trifft dieses zu, könnte man Phr als einen direkten Thermosensor bezeichnen.

Da Phr bei 107°C nicht mehr an die Promotoren der Hitzeschockgene bindet, sollte die Transkription dieser Gene bei Hitzeschock stark erhöht sein. Das ist bei *hsp20* (LAKSANALAMAI et al., 2001), *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr* (VIERKE et al., 2003) (Abb. 13) der Fall. Leicht erhöht sind die mRNA-Level des *aaa<sup>+</sup>atpase*- und des *phr*-Gens auch bei dem Übergang von der exponentiellen zu der stationären Wachstumsphase (Abb. 13). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expressionsprodukte der Gene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr* auch unter den ungünstigen Wachstumsbedingungen der stationären Phase verstärkt benötigt werden. Möglicherweise ist Phr also nicht nur ein Regulator der archaeellen Hitzeschockantwort, sondern spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der generellen Stressantwort.

Phr ist in der Zelle bei normalen Wachstumsbedingungen und bei Hitzeschockbedingungen gleichermaßen vorhanden (Abb. 14). Das Hitzeschockprotein Hsp20 ist dagegen nur in hitzegeschockten Zellen nachweisbar (LAKSANALAMAI et al., 2001). Es wird innerhalb von zehn Minuten nach einer Temperaturerhöhung auf 105°C maximal induziert (LAKSANALAMAI et al., 2001) und bleibt bei Inkubationszeiten von bis zu zwei Stunden auf diesem hohen Niveau (pers. Mitteilung F.T. ROBB). Unter regulatorischem Aspekt ist das sinnvoll, denn bei einem Hitzeschock werden die Hitzeschockproteine AAA<sup>+</sup>ATPase und Hsp20 von der Zelle gebraucht. Das hitzeinduzierte Hsp20 bindet denaturierte Proteine und schützt sie so vor der Aggregation. Die Funktion der AAA<sup>+</sup>ATPase ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise ist sie am Abbau denaturierter Proteine sowie eventuell an deren Rückfaltung beteiligt. Phr, der Repressor dieser Hitzeschockproteine, wird dagegen unter Hitzeschockbedingungen nicht vermehrt benötigt. Im Gegenteil, er muss denaturiert werden, um die Transkription der Hitzeschockgene freizugeben.

Die Tatsache, dass nach einem Hitzeschock nur unwesentlich mehr Phr nachzuweisen ist, aber die Transkription des *phr*-Gens um ein Vielfaches gesteigert ist, ist also vermutlich durch die Denaturierung und den verstärkten Abbau von Phr unter Hitzeschockbedingungen zu erklären. Da Phr bei einem Hitzeschock auch die Transkription seines eigenen Gens freigibt, ist diese gesteigerte mRNA-Synthese gewährleistet. Möglicherweise verhindert aber auch ein bisher unbekannter Regulationsmechanismus die Translation der Phr mRNA unter Hitzeschockbedingungen.

Die Affinität von Phr zu seinem eigenen Promotor ist geringer als zu dem Promotor der *aaa<sup>+</sup>atpase* und dem *hsp20*-Promotor (Abb. 6 und 9). Das stellt unter Nicht-Hitzeschockbedingungen sicher, dass zunächst die Promotoren der Hitzeschockgene gebunden werden. Erst später, wenn genug Phr synthetisiert wurde, um die Transkription der Hitzeschockgene zu hemmen, wird die Phr-Synthese abgeschaltet, indem der eigene Promotor gebunden wird. Die Autoregulation könnte hier also zur Feinabstimmung der Hitzeschockregulation dienen.

Die *in vivo*-Analysen geben einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie bei der Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort eine Rolle spielen. Es wurde beobachtet, dass der Transkriptionsfaktor TBP die Hitzeschockpromotoren *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* unter Hitzeschockbedingungen mit einer höheren Affinität bindet als unter Nicht-Hitzeschockbedingungen (siehe Abb. 15 und 16). Bei dem mesophilen, methanogenen Archaeon *Methanosarcina mazei*, das die Gene der Hsp70-Chaperon-Maschinerie besitzt (MACARIO et al., 1991; CONWAY DE MACARIO et al., 1994), wurde Ähnliches beschrieben. EMSAs mit den markierten Promotorregionen der Hitzeschockgene und dem Zellextrakt von nicht gestressten bzw. hitzegeschockten *M. mazei*-Kulturen, zeigten, dass die Hitzeschockpromotoren *hsp70*, *grpE* und *hsp40* unter Hitzeschockbedingungen verstärkt von TBP gebunden werden (DE BIASE et al., 2002). Es scheint also, als wäre der basale Transkriptionsapparat selbst an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt. Im Fall von *P. furiosus* wird demnach bei einem Hitzeschock zusätzlich zur Freigabe der Hitzeschockpromotoren durch Phr die Transkription der Hitzeschockgene durch die verstärkte Promotorbindung von TBP gesteigert. Wodurch die verstärkte TBP-Bindung an Hitzeschockpromotoren bei einem Hitzeschock allerdings verursacht wird, ist bisher unbekannt.

Die Tatsache, dass einige Archaea mehrere TBP- und/oder TFB-Homologe besitzen (PALMER et al., 1997; BALIGA et al., 2000), legt die Vermutung nahe, dass eventuell spezielle TBP-TFB-Paarungen für eine selektive Promotorerkennung zuständig sein könnten. In *P. furiosus* existieren nur eine Kopie des *tbp*-Gens und zwei Kopien des *tfb*-Gens. Untersuchungen von SHOCKLEY et al. (2003) haben gezeigt, dass die Transkription der Kopie eines *tfb*-Gens von *P. furiosus* unter Hitzeschockbedingungen aktiviert wird. Auch die Expression eines von mehreren *tfb*-Genen aus *Haloferax volcanii* wird hitzeabhängig induziert (THOMPSON et al., 1999). Für das hitzeinduzierte TFB-2 aus *P. furiosus* konnte bisher nur nachgewiesen werden, dass es in *in vitro*-Transkriptionsversuchen als Transkriptionsfaktor aktiv ist. Es konnte kein Unterschied in der *in vitro*-Transkription von



Hitzeschock- und Nicht-Hitzeschockpromotoren festgestellt werden (FRANKE, 2005). Bisher bleibt also unklar, ob die zweite Kopie des TFB bei *P. furiosus* eine Funktion hat, die im Zusammenhang mit der Hitzeschockantwort steht. Die Anwendung der in dieser Arbeit etablierten Methode der Formaldehydfixierung mit anschließender Immunpräzipitation von Protein-DNA-Komplexen bei *P. furiosus* könnte helfen, dieser Fragestellung nachzugehen. Die Immunpräzipitation müsste mit spezifischen Antikörpern gegen TFB-1 bzw. TFB-2, die miteinander nicht kreuzreagieren dürfen, erfolgen. Auf diese Weise könnte aufgezeigt werden, mit welchen Promotoren TFB-1 und TFB-2 *in vivo* jeweils wechselwirken und unter welchen Bedingungen diese Wechselwirkungen stattfinden.

Ebenso wie Phr bindet das Phr-Homolog aus *Archaeoglobus fulgidus* (HSR1, kodiert durch AF1298) spezifisch den Promotor seines eigenen Gens (ROHLIN et al., 2005). Das Gen für das Regulatorprotein HSR1 liegt aber im Gegensatz zum *phr*-Gen zusammen mit den Hitzeschockgenen *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* in einem Regulon (siehe Abb. 24). Während in *P. furiosus* die Gene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* alle über eigene Promotoren verfügen und über diese durch Phr-Bindung reguliert werden, werden die drei entsprechenden Gene in *A. fulgidus* offensichtlich über einen einzigen Promotor transkribiert und reguliert. Im Unterschied zu *P. furiosus* verfügt *A. fulgidus* außerdem über eine zweite Kopie des kleinen Hitzeschockproteins (AF1971, *hsp20-2*). Dieses Gen liegt nicht in dem oben beschriebenen Regulon, es wird aber auch durch Promotorbindung von HSR1 reguliert (ROHLIN et al., 2005). Die Funktion der homologen Proteine HSR1 aus *Archaeoglobus fulgidus* und Phr aus *Pyrococcus furiosus* bei der Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort ist also offensichtlich die gleiche. Beide Proteine sind Transkriptionsregulatoren der Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20* sowie des eigenen Gens. Der Mechanismus der Transkriptionshemmung durch diese beiden Proteine könnte auch analog sein. HSR1 überdeckt in DNaseI-Footprinting-Experimenten den Bereich der TATA-Box und des Transkriptionsstartpunktes. Ob die HSR1-Bindung bei der Initiation der Transkription mit der TBP-Bindung oder der RNA-Polymerase-Anlagerung interferiert, wurde bisher nicht näher untersucht. Es wird aber angenommen, dass HSR1 genau wie Phr die Assoziation der RNA-Polymerase an den Präinitiationskomplex verhindert (ROHLIN et al., 2005).

Ein deutlicher Unterschied zwischen Phr und HSR1 besteht aber in der DNA-Sequenz, die diese beiden Proteine erkennen. Für HSR1 wird das Palindrom 5'-CTAAC-5N-GTTAG-3' im Bereich des Transkriptionsstarts als Erkennungssequenz vorgeschlagen (ROHLIN et al., 2005). Diese Sequenz hat keine Ähnlichkeit zu der Phr-Erkennungssequenz (siehe IV.3) und

ist auch nicht in den durch Phr regulierten Promotoren zu finden. Umgekehrt kann auch die Phr-Erkennungssequenz nicht in den entsprechenden *A. fulgidus* Promotoren identifiziert werden. Trotz vermutlich gleicher regulatorischer Aufgaben und der hohen Sequenzübereinstimmungen von Phr und HSR1 erkennen diese homologen Proteine anscheinend unterschiedliche DNA-Sequenzen.

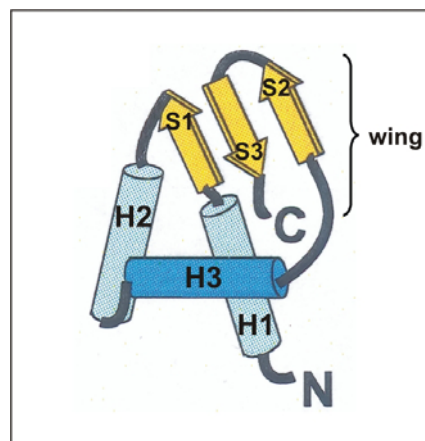
## **2. Phr ist ein Transkriptionsregulator der winged Helix-Familie mit einer neuartigen C-terminalen Struktur**

Ein wichtiges Ziel war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Regulators. Da keine Strukturen Phr homologer Proteine bekannt waren, die als Modell zur Phasenbestimmung dienen konnten, wurde ein Selenomethioninderivat von Phr synthetisiert. Bei diesem Protein wurden während der rekombinanten Expression alle fünf in Phr vorkommenden Methioninreste durch Selenomethionin ersetzt.

Die Strukturaufklärung erfolgte mit der Methode der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (engl.: „multiwavelength anomalous dispersion“, MAD; HENDRICKSON, 1991). Bei dieser Methode erfolgt die Datenaufnahme bei mehreren unterschiedlichen Wellenlängen, wobei die im Protein vorhandenen Schweratome als Fixpunkte für die Strukturberechnung dienen. Nach Auswertung der Daten konnte von Dr. Wei Liu aus der Arbeitsgruppe von Prof. Rudolf Ladenstein (Karolinska Institut, Schweden) die Struktur für Phr mit einer Auflösung von 3.0 Å bestimmt werden (siehe Abb. 27).

Phr ist aufgrund der ermittelten Struktur in die Gruppe der winged Helix (wHTH)-DNA-Bindeproteine, einer Unterfamilie der Helix-Turn-Helix-Proteine, einzuordnen. Zu dieser vielfältigen Gruppe gehört die Mehrheit der prokaryotischen Transkriptionsfaktoren (ARAVIND und KOONIN, 1999). Die Suche in der Protein-Datenbank nach Proteinen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Phr zeigt, dass bisher kein Protein mit ähnlicher Struktur beschrieben wurde. Vor allem in der C-terminalen Region gleicht Phr keiner bisher beschriebenen Proteinstruktur. Die größten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen bestehen im DNA-Bindemotiv von Phr. Das wHTH-Motiv von Phr gleicht am ehesten dem wHTH-Motiv von bakteriellen Transkriptionsregulatoren der ArsR-Familie (COOK et al., 1998; EICKEN et al., 2003). Winged Helix-Turn-Helix-Domänen sind kompakte  $\alpha/\beta$ -Strukturen, die sich in der Regel aus drei  $\alpha$ -Helices (H1, H2 und H3) und drei  $\beta$ -Strängen (S1, S2 und S3) in der Anordnung H1-S1-H2-H3-S2-S3 zusammensetzen (GAJIWALA und BURLEY, 2000). Dabei formen die  $\beta$ -Stränge S2 und S3 mit ihrer Verbindung den namensgebenden Flügel

(wing) des Motivs (CLARK et al., 1993). Die N-terminale Hälfte des wHTH-Bindemotivs ist somit durch den helikalen Kern charakterisiert, wohingegen der aus den  $\beta$ -Faltblättern gebildete Flügel den C-Terminus des Bindemotivs bestimmt. Der  $\beta$ -Strang (S1) zwischen Helix 1 und Helix 2 lagert sich mit der C-terminalen Schleife über Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Einheit zusammen (ARAVIND et al., 2005). In Abbildung 26 ist die wHTH-Domäne, wie sie für Proteine der ArsR-Familie bakterieller Transkriptionsregulatoren typisch ist, schematisch dargestellt.



**Abb. 26: Schematische Darstellung der wHTH-Domäne von Proteinen der ArsR-Regulatorfamilie (verändert nach Aravind et al., 2005).** Die Helices sind als blaue Zylinder dargestellt, dunkelblau die Erkennungshelix, und durch Beschriftung H1-H3 gekennzeichnet. Die  $\beta$ -Faltblattstränge sind als flache gelbe Pfeile dargestellt und durch Beschriftung S1-S3 gekennzeichnet. Der Flügel (wing) des Bindemotivs ist markiert.

Abbildung 27 zeigt das berechnete Strukturmodell des Phr-Dimers. Bei Phr befindet sich zusätzlich zu den drei Helices der klassischen wHTH-Motive eine vierte Helix am N-terminalen Ende des Motivs (Abb. 20 und 27). Für die DNA-Bindedomäne von Phr ergibt sich folgende Anordnung der Struktureinheiten: H1-H2-H3-H4-S1-S2, wobei die H2 von Phr der H1 klassischer wHTH-Domänen entspricht. Die H1 von Phr ist also dem eigentlichen wHTH-Bindemotiv N-terminal vorgelagert. Die  $\beta$ -Faltblätter formen auch im DNA-Bindemotiv von Phr den Flügel. Dieser ist etwas länger als bei Proteinen der ArsR-Familie. Zwischen H2 und H3 (entsprechend H1 und H2 klassischer wHTH-Motive) existiert bei Phr im Gegensatz zu den typischen Bindedomänen der ArsR-Proteinfamilie (siehe Abb. 26) kein  $\beta$ -Strang. Das ist aber auch bei anderen Proteinen der wHTH-Unterfamilie der Fall, wie zum Beispiel bei Proteinen der Lrp/AsnC-Familie (ARAVIND et al., 2005). Die Verbindung zwischen H2 und H3 befindet sich bei Phr aber dennoch in räumlicher Nähe zu dem aus S1 und S2 gebildeten Flügel. Das wHTH-Motiv von Phr liegt am N-Terminus des Proteins, wie

es für Transkriptionsrepressoren typisch ist (PÉREZ-RUEDA und COLLADO-VIDES, 2000 und 2001).



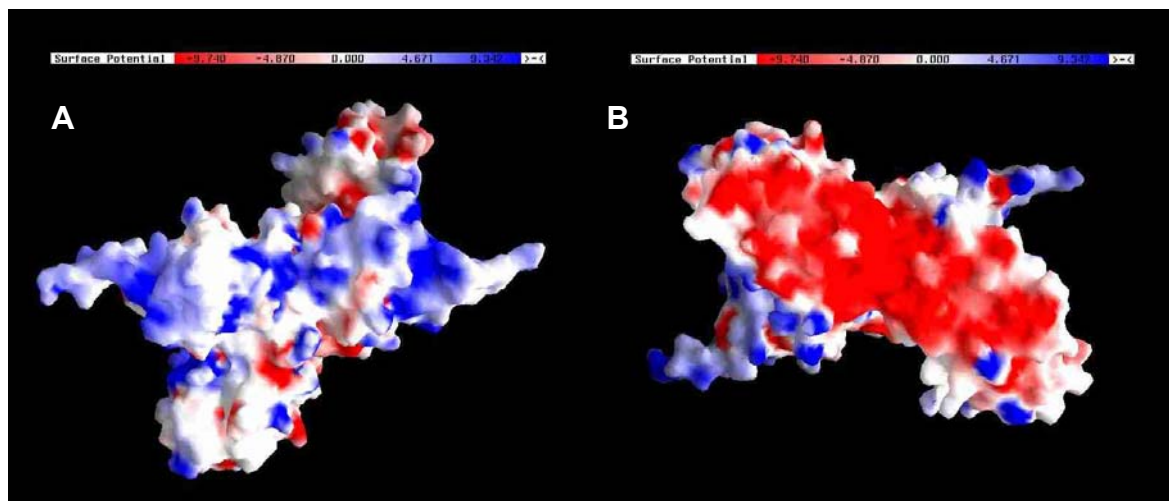
**Abb. 27: Strukturmodell von Phr (nach LIU et al., Proteindatenbank: 1XNP).** Die Untereinheiten des Dimers sind blau bzw. grün dargestellt. Die Positionen der Selen-Atome sind durch rote Kreise gekennzeichnet.  $\alpha$ -Helices sind als helikale Bänder und  $\beta$ -Faltblattstränge als flache Pfeile dargestellt. Die vier Helices des wHTH-Motivs sind an einem Monomer durch Beschriftung und gelbe Pfeile hervorgehoben.

Das DNA-Bindemotiv der ArsR-Familie bakterieller Transkriptionsregulatoren ist durch einige gut konservierte Aminosäurereste gekennzeichnet. Im N-terminalen Bereich des Bindemotivs befindet sich ein Cysteinrest, bei manchen Vertretern dieser Proteinfamilie auch ein zweiter. Im C-terminalen Bereich kommen ein oder zwei Histidinreste vor (BAIROCH, 1993; MORBY et al., 1993). Es wird angenommen, dass die Cystein- und Histidin-Reste an der Metallbindung dieser Proteine beteiligt sind (BAIROCH, 1993). Diese für die ArsR-Familie typischen N-terminalen Cysteinreste findet man in der Phr-Sequenz allerdings nicht. Im C-terminalen Bereich des wHTH-Motivs von Phr kommt ein Histidinrest vor. Zwischen Phr und den anderen Vertretern der ArsR-Familie gibt es deutliche Sequenzunterschiede.

Aufgrund der Sequenz von Phr gibt es keine Hinweise, dass Phr Metalle binden könnte. Es ist deshalb anzunehmen, dass eine Metallbindung bei Phr keine Rolle spielt.

Im Zentrum des Phr-Dimers befinden sich zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices und ein heterogenes  $\beta$ -Faltblatt. Besonders auffällig an der Phr-Struktur ist die lange C-terminal gelegene  $\alpha$ -Helix. Berechnungen der Oberflächenladungen des Proteins haben ergeben, dass der N-Terminus mit dem wHTH-Motiv stark positiv geladen ist (Abb. 28 A), dieser Teil des Proteins interagiert mit der negativ geladenen DNA. Der C-terminale Bereich von Phr, der sich aus der langen  $\alpha$ -Helix zusammensetzt, ist dagegen stark negativ geladen (Abb. 28 B). Möglicherweise interagiert der Regulator mit dieser Domäne mit einem bisher unbekannten Liganden oder einem anderen Protein.

Da Phr in seiner Struktur keinem anderen bisher charakterisierten Regulator gleicht, kann angenommen werden, dass Phr einen neuen, bisher unbekannten, Bindungstyp dimerer Transkriptionsregulatoren repräsentiert.



**Abb. 28: Elektrostatisches Oberflächenpotential von (A) der N-terminalen Bindedomäne und (B) des C-Terminus von Phr (nach LIU et al., unveröffentlicht). Positiv geladene Oberflächenbereiche sind in blau, negative in rot dargestellt.**

### 3. Der molekulare Mechanismus der Phr-DNA-Erkennung ist einzigartig

Die drei bekannten Gene, die durch Phr reguliert werden, weisen im Bereich des Transkriptionsstartpunktes die vermutete DNA-Erkennungssequenz von Phr (5'- TTT .. T .. C .. . . . G .. A .. AAA - 3') auf (Abb. 11). Trotz der vermutlich identischen DNA-Erkennungssequenz werden die drei Promotoren in *in vitro*-Transkriptionsversuchen und EMSA-Bindungsstudien unterschiedlich stark von Phr gebunden (Abb. 6 und 9). Der Promotor der *aaa<sup>+</sup>atpase* wird eindeutig am stärksten von Phr beeinflusst und der *phr*-Promotor am schwächsten. Da es sich bei diesen Versuchen um *in vitro*-Studien handelt, kann ausgeschlossen werden, dass noch andere Faktoren vorhanden sind, die die Protein-DNA-Bindung beeinflussen und unterschiedliche Bindungsaffinitäten herbeiführen. Es ist allerdings möglich, dass die Nukleotide zwischen den palindrombildenden Nukleotiden auch einen Einfluss auf die Bindungsaffinität an das Palindrom haben. Diese Nukleotide sind in allen drei Promotoren unterschiedlich.

Bei den Eukaryoten ist die sogenannte X-Box eine weit verbreitete Erkennungssequenz bestimmter Transkriptionsfaktoren. Sie kommt bei vielen eukaryotischen Genen vor und ist bisher am besten bei Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II (engl.: „major histocompatibility gene complex class II“, MHC II) untersucht (STEIMLE et al., 1995). Die X-Box dient als Bindestelle für Proteine der Regulator Faktor X (RFX)-Familie (siehe unten) und hat die Konsensussequenz 5'- GTNRCC (0-3N) RGYAAC -3', wobei N ein beliebiges Nukleotid ist, R ein Purin und Y ein Pyrimidin (EMERY et al., 1996 b). Diese Sequenz ähnelt auffallend der Sequenz des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors. Sie liegt fast vollständig, mit Ausnahme des letzten Nukleotids, in der Phr-Binderegion des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotors vor (siehe Abb. 12). Bei dem *hsp20*-Promotor ist ebenfalls eine ähnliche Sequenz zu finden, die sich aber in den letzten drei Nukleotiden von der eukaryotischen Konsensussequenz unterscheidet. Der *phr*-Promotor hat keine Ähnlichkeiten mit dieser Sequenz. Angenommen, Phr würde die X-Box-Konsensussequenz erkennen, wäre zu erklären, warum der *aaa<sup>+</sup>atpase*-Promotor besser gebunden wird als der *hsp20*-Promotor, und dieser wiederum besser als der *phr*-Promotor.

Die X-Box der Eukaryoten wird aber auch nicht immer durch das vollständige Konsensusmotiv repräsentiert. Bei der Bindung des menschlichen Transkriptionsfaktors RFX1 besteht eine strikte Abhängigkeit von nur einer Hälfte der X-Box, die andere Hälfte kann dagegen stark von der Konsensussequenz abweichen (EMERY et al., 1996 b). Das geht

mit der Tatsache einher, dass dieses Protein nicht nur als Dimer, sondern auch in monomerer Form die X-Box binden kann (SIEGRIST et al., 1993). Bei der Bindung als Monomer wird entsprechend nur die konservierte X-Box-Hälfte gebunden. Im Fall von Phr ist allerdings keine monomere Bindung bekannt.

Zur Ermittlung der definitiven Phr-Erkennungssequenz werden die ChIP-to-chip-Versuche beitragen. Die aus den lebend fixierten *P. furiosus*-Zellen gewonnenen Immunpräzipitate bestehen aus der Gesamtheit der zum Zeitpunkt der Fixierung an Phr gebundenen DNA. Diese Immunpräzipitate wurden mit Linkern versehen, amplifiziert und fluoreszenz markiert (Abb. 3 und 17). In Microarray-Analysen, die in Kooperation mit dem Labor von Prof. Michael Adams (Georgia, USA) durchgeführt werden, werden die markierten Immunpräzipitate gegen DNA-chips mit dem gesamten *Pyrococcus furiosus*-Genom hybridisiert werden. Mit Hilfe dieser Methode sollten im Idealfall alle durch Phr regulierten Gene nachgewiesen werden. Falls neben den drei bekannten Hitzeschockgenen noch andere Zielgene von Phr gefunden werden, trägt das zu einem besseren Verständnis der Funktion von Phr bei.

Die oben genannte X-Box wird bei den Eukaryoten von Proteinen der sogenannten RFX- (Regulator Faktor X) Familie (EMERY et al., 1996 a, b) erkannt. RFX-Proteine sind Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren und sind bei den Eukaryoten sehr konserviert und weit verbreitet. Sie haben vielfältige regulatorische Funktionen, unter anderem die Regulation des mitotischen Zellzyklus bei sich teilenden Hefezellen (WU und McLEOD, 1995), eine Kontrollfunktion bei der Immunantwort von Säugetieren (STEIMLE et al., 1995), oder sie spielen eine Rolle bei der Infektion mit dem menschlichen Hepatitis B-Virus (REITH et al., 1994). Für humanes RFX1 (hRFX1) wurde interessanterweise ein an Phr erinnernder Regulationsmechanismus beschrieben. Während viele Proteine der RFX-Familie als Transkriptionsaktivatoren DNA-Sequenzen erkennen, die nicht in unmittelbarer Promotornähe liegen, bindet hRFX1 als ein Repressor an eine X-Box, die den Transkriptionsstartpunkt des Kollagens  $\alpha 2(1)$  überdeckt (SENGUPTA et al., 1999; SENGUPTA et al., 2002). Diese Art der Transkriptionsregulation ist bei Säugetieren nicht weit verbreitet. In den Grundzügen ähnelt dieser Mechanismus der Regulation durch Phr. Allerdings ist die Wirkungsweise von hRFX1 deutlich komplexer als das hier beschriebene archaeelle System. Humanes RFX1 kann die DNA nicht nur als Homodimer, sondern auch als Heterodimer mit RFX2 binden. Außerdem spielen bei der Genregulation durch hRFX1 DNA-Methylierungen eine Rolle. Durch Methylierung eines bestimmten Cytosins in der DNA-

Erkennungssequenz wird die Bindeaffinität von hRFX1 gesteigert (SENGUPTA et al., 2002; SENGUPTA et al., 2005).

Das DNA-Bindemotiv der RFX-Proteine ist ein wHTH-Motiv (CLARK et al., 1993; LAI et al., 1993; GAJIWALA et al., 2000). Die Kenntnisse der Kristallstruktur von Phr (LIU et al., Proteindatenbank: 1XNP) und Sequenzanalysen bestätigen auch für Phr ein wHTH-DNA-Bindemotiv (Abb. 27 und IV.2). Es sind also deutlich Übereinstimmungen in den Bindemotiven und den DNA-Erkennungssequenzen von Phr und den eukaryotischen RFX-Proteinen vorhanden. Sequenzähnlichkeiten zwischen Phr und Proteinen der RFX-Familie, die über das wHTH-Motiv hinausgehen, gibt es aber nicht.

Wie interagiert nun das wHTH-DNA-Bindemotiv mit der DNA-Erkennungssequenz?

Es wurden bereits einige eukaryotische und bakterielle wHTH-Proteine kristallisiert und ihre Struktur sowie ihre Wechselwirkungen mit der DNA charakterisiert (GAJIWALA et al., 2000; SAFO et al., 2005). Die meisten wHTH-Proteine binden die DNA mit der Helix 3 (Erkennungshelix), die spezifische Kontakte mit der großen Furche der DNA ausbildet. Der Flügel (wing) dieser Proteine geht dabei Interaktionen mit der kleinen Furche der DNA ein (BRENNAN, 1993; CLARK et al., 1993; SWINDELLS, 1995). Der leberspezifische Transkriptionsfaktor HNF3, der als erster Vertreter der wHTH-Proteine kristallisiert wurde (CLARK et al., 1993), bindet DNA auf diese Weise. Auch der Transkriptionsregulator von SOS-Genen in *E. coli*, LexA, interagiert vermutlich, wie viele andere wHTH-Proteine, entsprechend mit der DNA (FOGH et al., 1994).

Ein anderer Mechanismus der Protein-DNA-Bindung wurde mit der Kristallisierung des hRFX1-DNA-Komplexes entdeckt. In diesem Fall bildet der Flügel des wHTH-Motivs von hRFX1 die stärksten Kontakte mit der DNA aus, indem er mit der großen Furche der DNA in Wechselwirkung tritt. Die sogenannte Erkennungshelix 3 bildet dagegen nur geringfügige DNA-Kontakte mit der kleinen Furche der DNA über eine einzige Aminosäureseitenkette aus (GAJIWALA et al., 2000). Die DNA-Bindung von bisher charakterisierten wHTH-Proteinen wird also entweder über die Helix 3 (Erkennungshelix) oder den Flügel (wing) vermittelt.

DNA-Bindungsstudien mit Phr-Mutanten erbrachten den überraschenden Befund, dass für die Phr-Bindung an den Operator des *aaa<sup>+</sup>atpase*-Gens Aminosäuren in drei Helices und dem Flügel essentiell sind (WENKE, 2004). Es handelt sich dabei im Einzelnen um die Aminosäuren T16 und R17 in Helix 2, S32 in Helix 3, K43 in Helix 4 sowie R69 und R71 im Flügel der wHTH-Domäne. Besonders wichtig für die DNA-Bindung scheinen die



Aminosäuren R17 in Helix 2 und R69 im Flügel zu sein, da Mutanten, bei denen eine dieser Aminosäuren ausgetauscht wurde, so gut wie keine spezifischen DNA-Interaktionen mehr zeigen. Die Helix 4 von Phr entspricht der Erkennungshelix 3 klassischer wHTH-Proteine. Daher wurden mehrere Mutanten analysiert, bei denen eine Aminosäure in dieser Helix ausgetauscht wurde. Es zeigte sich, dass lediglich eine von sechs untersuchten Aminosäuren (K43) der Helix 4 für die DNA-Bindefähigkeit von Phr von Bedeutung ist. Diese Versuche führen zu der Annahme, dass die stärksten DNA-Kontakte von Phr nicht von der klassischen Erkennungshelix ausgehen. Der Flügel ist durch den Nachweis zweier essentiell für die DNA-Bindung benötigter Aminosäuren stärker an der DNA-Bindung beteiligt. Da aber auch Aminosäuren der Helix 2 und der Helix 3 für die DNA-Bindung wichtig sind, lässt sich anhand dieser Versuche nicht sagen, über welche Struktur der wHTH-Domäne Phr die Hauptkontakte mit der DNA eingeht. Es sieht aber so aus, als wären mehrere Strukturen der wHTH-Domäne an der Interaktion mit der DNA beteiligt. Diese Ergebnisse werden auch durch die molekulare Simulation der Phr-Bindung an die DNA bestätigt (LIU et al., unveröffentlicht), was darauf hindeutet, dass der Hitzeschockregulator Phr auf eine bisher noch nicht beschriebene Weise die DNA bindet.

Um diesen neuartigen Bindungsmechanismus genauer zu charakterisieren, wurden Cokristallisationsversuche von an DNA gebundenem Phr vorgenommen. Für diesen Zweck wurde eine verkürzte Form von Phr hergestellt, die fast ausschließlich aus dem wHTH-DNA-Bindemotiv besteht, da angenommen wurde, dass die lange C-terminale  $\alpha$ -Helix möglicherweise bei der Cokristallisation störend wirken könnte. Das verkürzte Protein, das aus den Aminosäuren 1 bis 96 bestand (Phr<sub>AS1-96</sub>, vgl. Abb. 20), war - genauso wie Phr vollständiger Länge - in der Lage, die Phr-Erkennungssequenz eines Oligonukleotids zu binden (Abb. 22). Die deletierte C-terminale  $\alpha$ -Helix ist also weder für die DNA-Bindung noch für die Dimerisierung des Phr von Bedeutung. Es liegen Kristalle der Protein-DNA-Komplexe vor (LIU et al., unveröffentlicht), die Strukturberechnungen sind aber noch nicht abgeschlossen. Mit Hilfe dieser Daten soll die molekulare Interaktion des Hitzeschockregulators mit der DNA im Detail aufgeklärt werden.

Für die Charakterisierung der Protein-DNA-Bindung ist auch die Bestimmung der Bindungsaffinität interessant. Die Affinitätskonstante  $K_D$  kann am Genauesten mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz (engl.: „Surface Plasmon Resonance“, SPR) bestimmt werden. Hierzu wird ein Bindungspartner kovalent an eine Matrix gekoppelt und der andere Bindungspartner in einem Laufpuffer darüber geleitet. Über eine Optik wird die Massenzunahme auf der Matrix gemessen, die bei Bindung des gelösten Partners mit dem

Interaktionspartner auf der Matrix zustande kommt. Auf diese Weise können exakte Bindekurven erstellt werden. Um die SPR anwenden zu können, wurde Phr mit einem C-terminalen His-Tag hergestellt (Abb. 23). Das C-terminal mit einem His-Tag fusionierte Protein wurde dem N-terminalen Fusionsprotein vorgezogen, da man nicht ausschließen konnte, dass bei Bindung des N-Terminus an die Matrix die Bindedomäne wohlmöglich nicht frei zugänglich wäre. Mit dem C-terminalen His-Tag konnte das Protein an die Sensoroberfläche immobilisiert werden, so dass der N-Terminus frei war für die DNA-Bindung. Die SPR-Versuche wurden von Dr. Wei Liu aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ladenstein in Stockholm durchgeführt.

#### **4. Vergleich der archaeellen Hitzeschockregulation durch Phr mit bekannten bakteriellen Repressorsystemen**

Der molekulare Mechanismus der Phr-Interaktion mit der DNA unterscheidet sich von denen bisher charakterisierter winged-Helix-Proteine (IV.3). Dennoch ist bei einem Vergleich der Hitzeschockregulation von *P. furiosus* mit den bekannten bakteriellen und eukaryotischen Regulationsmechanismen eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Repressorsystemen erkennbar. Bei den Bacteria wurden bereits zahlreiche unterschiedliche repressorabhängige Kontrollmechanismen von Hitzeschockgenen charakterisiert (zusammengefasst bei NARBERHAUS, 1999). Dabei bindet ein Repressorprotein im Promotorbereich eines Hitzeschockgens an eine konservierte, oft aus umgekehrten Sequenzwiederholungen (engl.: „inverted repeat“) bestehende Sequenz und verhindert so die Expression des Hitzeschockgens (vgl. Abb. 2).

Auch bei den kleinen Hitzeschockproteinen (sHsps) der Bacteria kommt diese Art der Transkriptionsregulation vor. Das hitzeinduzierte sHsp, Hsp18, von *Streptomyces albus* steht unter der Kontrolle des Regulators RheA (= repressor of hsp eighteen). RheA reprimiert unter normalen Wachstumsbedingungen durch Promotorbindung die Transkription von *hsp18* und die seines eigenen Gens (SERVANT und MAZODIER, 1996). Bei einer Temperaturerhöhung auf Hitzeschockbedingungen (bei *S. albus* von 30°C auf 41°C) bindet RheA die Promotoren nicht mehr. Hier fallen deutlich Parallelen zu der Regulation des sHSP in *Pyrococcus furiosus* durch Phr auf. Allerdings kommt die Aufhebung der Promotorbindung bei RheA nicht wie im Fall von Phr durch eine Hitzedenaturierung zustande, sondern durch eine temperaturbedingte reversible Konformationsveränderung, wie durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie nachgewiesen wurde (SERVANT et al., 2000).

Auch das Gen des sHsp aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus vulcanus*, *hspA*, wird möglicherweise durch die Interaktion eines Repressors mit einem DNA-Element reguliert. In Bindestudien konnte nachgewiesen werden, dass ein bisher unbekannter Faktor aus dem Zellextrakt unter Nicht-Hitzeschockbedingungen an eine umgekehrte Wiederholungssequenz, die zwischen dem Transkriptions- und dem Translationsstartpunkt liegt, bindet und so vermutlich die Transkription des Hitzeschockgens verhindert. Es wird angenommen, dass dieser Faktor bei einer Temperaturerhöhung aufgrund eines temperaturbedingten Stabilitätsverlustes vom Promotor abfällt und damit die Expression des sHsp induziert (KOJIMA und NAKAMOTO, 2002). Es konnte allerdings bisher noch kein dafür verantwortlicher Repressor isoliert werden. Außerdem wurde mittlerweile nachgewiesen, dass der Hauptmechanismus der Regulation dieses sHSP bei *Synechococcus* wahrscheinlich auf posttranskriptionaler Ebene abläuft (KOJIMA und NAKAMOTO, 2005) (siehe unten). Bei verschiedenen anderen sHsps aus grampositiven Bacteria wurden ebenfalls Sequenzen in der Promotorregion gefunden, die Ähnlichkeiten zu bekannten bakteriellen Operatorsequenzen aufweisen. Entsprechende Regulatoren konnten aber bisher nicht identifiziert werden (DERRÉ et al., 1999). Bei der Regulation der bakteriellen sHSP sind also Mechanismen beteiligt, die entfernt an die Regulation des Hsp20 von *Pyrococcus furiosus* durch Phr erinnern. Diese bakteriellen Repressorproteine sind aber zum größten Teil noch nicht isoliert und charakterisiert worden. Für kein einziges dieser Proteine wurde bisher die dreidimensionale Struktur bestimmt, weshalb der genaue Mechanismus der Protein-DNA-Interaktion noch nicht bekannt ist und nicht mit dem von Phr verglichen werden kann.

Insgesamt stellt die negative Kontrolle durch Repressoren im Gegensatz zur Hitzeschockregulation durch alternative Sigmafaktoren eine direktere Antwort der Zelle auf eine Stresssituation dar. Die repressorabhängige Regulation bedarf keiner so differenzierten Kontrollmechanismen, wie sie bei der Aktivierung von speziellen Sigmafaktoren erforderlich sind. Eine Induktion durch Hitze wirkt direkt auf die Repressoraktivität, was eine schnelle und ökonomische Regulation der Genaktivität zur Folge hat. Wie zuvor schon festgestellt wurde, zeigt der hyperthermophile Organismus *Pyrococcus furiosus*, verglichen mit anderen, nicht hyperthermophilen Organismen, ein weniger komplexes Hitzeschocksystem. Das spiegelt sich nicht nur in der begrenzten Anzahl der beteiligten Hitzeschockproteine, sondern auch in ihrer Regulation wider. Während bei den Bacteria die negativen Regulationsmechanismen zusammen mit den positiven ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk bilden und bei den Eukaryoten die sehr unterschiedliche Aktivierung der

verschiedenen HSF notwendig ist, ist möglicherweise bei *P. furiosus* für die Induktion der Hitzeschockgene unter Stressbedingungen ein einziges Repressorprotein zuständig.

Aufgrund der erst relativ kurzen Zeit der Forschung auf dem Gebiet der archaeellen Hitzeschockregulation und der noch begrenzten Anzahl an Daten ist es natürlich möglich, dass neben Phr noch andere, bisher unbekannte Hitzeschockregulatoren existieren. Trotz der vergleichsweise geringen Genomgröße von *Pyrococcus furiosus* sind noch nicht alle Gene einer möglichen Funktion zugeordnet worden. Des Weiteren finden sich Unterschiede in den beiden von verschiedenen Datenbanken annotierten *Pyrococcus furiosus*-Genomen, und es liegen noch Gene vor, die bisher nicht annotiert werden konnten (POOLE et al., 2005). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die hier untersuchten Regulationsmechanismen komplexer sind, als auf den ersten Blick angenommen. Möglicherweise arbeitet Phr mit einem weiteren Regulator zusammen. Die lange C-terminale  $\alpha$ -Helix von Phr mit ihrer stark negativen Ladung scheint eine geeignete Domäne zu sein, um mit einem Regulationspartner zu interagieren. Versuche, im Zelllysate von *Pyrococcus furiosus* einen Bindepartner von Phr zu fischen, blieben allerdings bisher erfolglos. Auch Coimmunpräzipitationsversuche mit Phr-Antikörpern konnten kein an Phr bindendes Protein identifizieren.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die archaeelle Hitzeschockantwort zusätzlich durch Prozesse, die nicht auf transkriptioneller Ebene ablaufen, kontrolliert wird.

Bei Rhizobien stehen die Gene, die für die sHsps kodieren, zum Beispiel unter posttranskriptionaler Kontrolle durch das sogenannte ROSE (repression of heat shock gene expression)-Element (NARBERHAUS et al., 1998). ROSE ist ein etwa 100 Basenpaar langes DNA-Element, welches sich in der nicht translatierten Region zwischen Transkriptions- und Translationsstart (5'-untranslatierte Region) eines Hitzeschockgens befindet. Es wird angenommen, dass die Sekundärstruktur der ROSE-mRNA sowohl die Translationseffizienz als auch die mRNA-Degradation beeinflusst (NOCKER et al., 2001). Bei normalen Wachstumstemperaturen bildet die ROSE-mRNA eine Schleife, die den Zugang der Ribosomen zu der Ribosomenbindestelle blockiert. Dadurch wird einerseits die Initiation der Translation verhindert, andererseits durch das Fehlen der stabilisierend wirkenden Ribosomen der mRNA-Abbau gefördert. Steigen die Temperaturen auf Hitzeschockbedingungen an, schmilzt die ROSE-Sekundärstruktur auf, die Ribosomen können binden, und die Translation der Hitzeschockgene erfolgt. Dieses Modell der posttranskriptionalen Kontrolle von Hitzeschockgenen wurde postuliert, nachdem ein ursprünglich vermuteter, an die ROSE-Sequenz bindender Repressor nicht identifiziert werden konnte (NOCKER et al., 2001). Das

verdeutlicht, dass die Mechanismen der Genregulation tatsächlich oft vielschichtiger sind, als zunächst angenommen. Durch *in silico*-Analysen wurden inzwischen auch in anderen Bakterien (in der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien) potentielle ROSE-Elemente stromaufwärts von sHSP-Genen identifiziert (WALDMINGHAUS et al., 2005). Diese neu entdeckten ROSE-Elemente haben deutliche strukturelle Ähnlichkeiten, die auf eine entsprechende Funktion schließen lassen, aber nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten zu den ROSE-Elementen der Rhizobien. Die mRNA-Stabilität einer 5'-untranslatierten Region scheint ein grundlegender Mechanismus bei der Regulation der sHSP in Bacteria zu sein.

Bei archaeellen Hitzeschockgenen gibt es keine entsprechend langen 5'-untranslatierten Regionen, die ROSE-ähnliche Funktion haben könnten. Allerdings wurde festgestellt, dass ein ähnlicher Mechanismus bei der Regulation von archaeellen Kälteschockproteinen eine Rolle spielt. Genau wie bei Bakterien (PHADTARE et al., 1999; CHAMOT et al., 1999) wird das Gen für die kälteinduzierte RNA-Helikase (*deaD*) bei dem psychophilen Archaeon *Methanococcoides burtonii* mit einer langen 5'-untranslatierten Region transkribiert (LIM et al., 2000). Die Funktion dieser untranslatierten Region bei dem Archaeon ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die 5'-untranslatierte Region für die mRNA-Stabilität bei niedrigen Wachstumstemperaturen wichtig ist und bei höheren Temperaturen ein instabiles Transkript produziert. Auch die Beteiligung eines Regulatorproteins, das an die 5'-untranslatierte Region bindet, wird diskutiert (LIM et al., 2000). Der genaue Mechanismus der Regulation der archaeellen Kälteschockproteine bleibt bisher aber unklar.

Im Fall der archaeellen Hitzeschockregulation spielen oben genannte 5'-untranslatierte Regionen keine Rolle. Es ist aber möglich, dass posttranskriptionale Modifikationen wie Methylierungen oder Phosphorylierungen oder eine Veränderung der DNA-Topologie unter Stressbedingungen bei der Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort von Bedeutung sind. Des Weiteren wäre ein Zusammenspiel von Hitzeschockproteinen mit dem bei *P. furiosus* unter Hitzeschockbedingungen vermehrt vorkommenden Dimyoinositolphosphat denkbar.

Die Charakterisierung des archaeellen Hitzeschockregulators Phr in dieser Arbeit verhilft zu einem ersten Verständnis über die archaeellen Regulationsmechanismen der Stressantwort. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Phr-DNA-Komplexes sowie die genomweite Analyse von Phr-Bindesequenzen durch die Microarray-Technologie werden weitere Einblicke in diese Thematik bringen.

## V Zusammenfassung

Wie alle Organismen weist auch das hyperthermophile Archaeon *Pyrococcus furiosus* bei einer Temperaturerhöhung, die über die optimale Wachstumstemperatur hinausgeht, eine Hitzeschockantwort auf. Im Gegensatz zu den bakteriellen und eukaryotischen Systemen ist über die Regulation der archaeellen Hitzeschockantwort bisher wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den ersten archaeellen Hitzeschockregulator. Es handelt sich um das Protein Phr (*Pyrococcus* heat shock regulator), welches durch den ORF PF1790 kodiert wird. Dieses Protein ist in verschiedenen Euryarchaeota konserviert. Es existieren keine bakteriellen oder eukaryotischen Homologe.

Phr hemmt spezifisch die *in vitro*-Transkription der beiden im *Pyrococcus furiosus*-Genom direkt hintereinander liegenden Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *hsp20*. Außerdem hemmt Phr als Autoregulator die Transkription seines eigenen Gens. Durch EMSAs und DNaseI-Footprint-Analysen konnte der Mechanismus der Transkriptionshemmung aufgeklärt werden. Phr bindet die Hitzeschockpromotoren direkt stromabwärts der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB und überlagert dabei den Transkriptionsstartpunkt. Dadurch wird die Anlagerung der RNA-Polymerase blockiert und die Initiation der Transkription verhindert.

Im Bindebereich von Phr konnte in allen drei Hitzeschockpromotoren das Palindrom 5'- TTT ... T ... C ... G ... A ... AAA - 3' identifiziert werden, welches als Erkennungssequenz von Phr vorgeschlagen wird.

*In vivo* Studien zeigten, dass die Gene *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr* unter Hitzeschockbedingungen verstärkt transkribiert werden. Auch beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase wird vermehrt *aaa<sup>+</sup>atpase* und *phr*-mRNA gebildet, was dafür spricht, dass diese Hitzeschockproteine möglicherweise auch im Stress der stationären Wachstumsphase eine Rolle spielen könnten.

Um die Phr-Bindung *in vivo* zu untersuchen, wurden Protein-DNA-Komplexe kovalent miteinander vernetzt. Nach Scheren der DNA und einer anschließenden Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen Phr wurden die an Phr gebundenen Gene identifiziert (ChIP-Technik). Auf diese Weise wurde bestätigt, dass Phr auch *in vivo* - bei 95°C - die Promotorsequenzen der Hitzeschockgene *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* und *phr* bindet. Bei 107°C, also unter Hitzeschockbedingungen, ist die Phr-Bindung an die Promotoren dagegen nicht mehr nachweisbar. Das könnte bedeuten, dass der Regulator Phr als direkter Thermosensor wirkt, indem er unter normalen Wachstumsbedingungen durch Promotorbindung die Transkription

der Hitzeschockgene unterbindet. Bei einer Temperaturerhöhung dagegen denaturiert das Regulatorprotein und die Transkription der Hitzeschockgene wird durch die Dissoziation des Repressors von der DNA ermöglicht.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Ladenstein (Karolinska Institut, Schweden) wurde die Struktur von Phr mit einer Auflösung von 3 Å bestimmt. Hierzu wurde ein Selenomethioninderivat von Phr hergestellt, bei dem alle fünf in Phr vorhandenen Methioninreste durch Selenomethionin ersetzt wurden. Die Strukturaufklärung erfolgte mit der Methode der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (MAD). Der N-terminale Teil von Phr besteht aus einem wHTH-DNA-Bindemotiv. Dem klassischen wHTH-Motiv, das aus drei Helices besteht, ist eine vierte Helix N-terminal vorgelagert. Im zentralen Teil des Phr-Dimers bilden sich ein antiparalleles Zwei-Helix-Bündel und ein heterogenes  $\beta$ -Faltblatt aus. Der C-terminale Bereich wird dominiert durch eine lange, stark negativ geladene  $\alpha$ -Helix. Phr stellt damit vermutlich einen neuen Typ dimerer Transkriptionsfaktoren dar. Auch der Modus der DNA-Interaktion unterscheidet sich von denen bisher beschriebener wHTH-Proteine. Während die schon charakterisierten wHTH-Proteine die DNA entweder mit der Erkennungshelix 3 oder dem Flügel der DNA-Bindedomäne binden, sind bei Phr Aminosäuren in drei Helices sowie dem Flügel an der DNA-Bindung beteiligt.

Um die Phr-DNA-Bindung auf molekularer Ebene genauer zu untersuchen, wurde eine am C-Terminus um 106 Aminosäuren verkürzte Form von Phr hergestellt. Dieses hauptsächlich aus dem DNA-Bindemotiv bestehende Protein wurde zusammen mit Oligonukleotiden mit der Phr-Erkennungssequenz von Dr. Wei Liu aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ladenstein in Cokristallisationsversuche eingesetzt. Kristalle dieser Protein-DNA-Komplexe liegen bereits vor, die Strukturberechnungen sind aber noch nicht abgeschlossen.

Durch die Aufarbeitung der durch die ChIP-Methode gewonnenen Präzipitate für Microarray-Analysen wurde der Weg bereitet, alle Phr-Bindestellen im *Pyrococcus*-Genom zu ermitteln. Die Microarray-Analysen werden in Kooperation mit dem Labor von Professor Michael Adams (Georgia, USA) durchgeführt.

## VI Summary

Like all organisms the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* shows a heat shock response when temperature increases above the optimal growth temperature. In contrast to bacterial and eukaryotic systems little is known about regulation of the archaeal heat shock response.

The present work describes the first archaeal heat shock regulator. It is the protein Phr (*Pyrococcus* heat shock regulator), which is encoded by ORF PF1790. Phr is conserved among several Euryarchaeota. There are no bacterial or eukaryotic homologues.

Phr specifically inhibits *in vitro* transcription of the two heat shock genes *hsp20* and *aaa<sup>+</sup>atpase*, which lie in a row in the *Pyrococcus furiosus* genome. Phr is also an autoregulator by inhibiting transcription of its own gene. EMSAs and DNaseI footprinting analyses revealed the mechanism of transcription inhibition by Phr. Phr binds to the heat shock promoter downstream of the transcription factors TBP and TFB and covers the transcription start site, blocking association of RNA polymerase and inhibiting transcription initiation.

The palindrome 5'- TTT .. T .. C ..... G .. A .. AAA - 3' could be identified in the Phr binding region of the three heat shock promoters. This sequence is proposed to be the Phr recognition site.

*In vivo* studies showed increased transcription of *aaa<sup>+</sup>atpase* and *phr* under heat shock conditions. Transcription is also increased at stationary growth phase, indicating that Phr might also act as a general stress factor.

To get insights into Phr binding *in vivo*, protein-DNA complexes were crosslinked. After shearing DNA and immunoprecipitation with Anti-Phr the genes bound by Phr were identified (ChIP-technology). With this assay we showed, that Phr binds to the heat shock promoters of *aaa<sup>+</sup>atpase*, *hsp20* and *phr in vivo* at 95°C. However there is no Phr binding detectable under heat shock conditions at 107°C. Phr might act as a direct thermosensor by binding to heat shock promoters under normal growth conditions and thereby inhibits transcription of these genes. Under heat shock conditions Phr denaturates, dissociates from the promoters and enables heat shock gene transcription.

The Phr structure was solved at a resolution of 3 Å in cooperation with Prof. Ladenstein's lab (Karolinska Institute, Sweden). For this a selenomethionine derivative of Phr was synthesized, in which all five methionine residues of Phr were substituted by selenomethionine. The



structure was solved using the multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method. The N-terminal part of Phr contains a wHTH DNA binding motif. In this motif there is an additional fourth helix at the N-terminus of the classical wHTH motif, which consists of only three helices. In the central part of the Phr dimer there is an antiparallel two-helix bundle and a heterogeneous  $\beta$ -sheet. The C-terminal part is characterized by a long, negatively charged  $\alpha$ -helix. Phr may represent a novel folding type among dimeric transcription factors. The mode of Phr-DNA interaction is also different from other winged helix proteins. Whereas the already characterized winged helix proteins bind DNA with the recognition helix 3 or the wing, Phr uses aminoacids in three helices and the wing for DNA binding.

To investigate Phr-DNA interaction at molecular level, a truncated version of Phr was constructed. This protein lacks 106 aminoacids at the C-terminus and is basically composed of the DNA binding motif. Dr. Wei Liu (group of Prof. Ladenstein, Sweden) crystallized the truncated Phr in the presence of oligonucleotides that contain the Phr recognition sequence. However the design of the Phr-DNA complex structure is not finished yet.

The ChIP-method is the first step for investigating all Phr binding sites in the *Pyrococcus* genome with microarrays. The microarray analyses will be made in cooperation with Prof. Michael Adams' lab (Georgia, USA).

## VII Literaturverzeichnis

- Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu and L. M. Iyer (2005). "The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond." *FEMS Microbiol Rev* **29**(2): 231-62.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (1999). "DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea." *Nucleic Acids Res* **27**(23): 4658-70.
- Archibald, J. M., J. M. Logsdon and W. F. Doolittle (1999). "Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins." *Curr Biol* **9**(18): 1053-6.
- Bairoch, A. (1993). "A possible mechanism for metal-ion induced DNA-protein dissociation in a family of prokaryotic transcriptional regulators." *Nucleic Acids Res* **21**(10): 2515.
- Baliga, N. S., Y. A. Goo, W. V. Ng, L. Hood, C. J. Daniels and S. DasSarma (2000). "Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors?" *Mol Microbiol* **36**(5): 1184-5.
- Bauer, M. W., S. Bauer, and R. M. Kelly (1997). "Purification and characterization of a proteasome from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1160-1164.
- Bell, S. D., A. B. Brinkman, J. van der Oost and S. P. Jackson (2001). "The archaeal TFII $\alpha$  homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition." *EMBO Rep* **2**(2): 133-8.
- Bell, S. D., S. S. Cairns, R. L. Robson and S. P. Jackson (1999). "Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro." *Mol Cell* **4**(6): 971-82.
- Bell, S. D. and S. P. Jackson (1998). "Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features." *Trends Microbiol* **6**(6): 222-8.
- Bell, S. D. and S. P. Jackson (2000). "Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor." *J Biol Chem* **275**(41): 31624-9.
- Bouthier de la Tour, C., C. Portemer, M. Nadal, K. O. Stetter, P. Forterre and M. Duguet (1990). "Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria." *J Bacteriol* **172**(12): 6803-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brennan, R. G. (1993). "The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff." *Cell* **74**(5): 773-6.

- Brinkman, A. B., I. Dahlke, J. E. Tuininga, T. Lammers, V. Dumay, E. de Heus, J. H. Lebbink, M. Thomm, W. M. de Vos and J. van Der Oost (2000). "An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated." *J Biol Chem* **275**(49): 38160-9.
- Budisa, N., B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann and R. Huber (1995). "High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* **230**(2): 788-96.
- Bukau, B. (1993). "Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response." *Mol Microbiol* **9**(4): 671-80.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. Geoghagen and J. C. Venter (1996). "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*." *Science* **273**(5278): 1058-73.
- Cao, K., R. Nakajima, H. H. Meyer and Y. Zheng (2003). "The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis." *Cell* **115**(3): 355-67.
- Chamot, D., W. C. Magee, E. Yu and G. W. Owttrim (1999). "A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase." *J Bacteriol* **181**(6): 1728-32.
- Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai and S. K. Burley (1993). "Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5." *Nature* **364**(6436): 412-20.
- Conway de Macario, E., C. B. Dugan and A. J. Macario (1994). "Identification of a *grpE* heat-shock gene homolog in the archaeon *Methanosarcina mazei*." *J Mol Biol* **240**(1): 95-101.
- Cook, W. J., S. R. Kar, K. B. Taylor and L. M. Hall (1998). "Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins." *J Mol Biol* **275**(2): 337-46.
- Craig, E. A., B. D. Gambill and R. J. Nelson (1993). "Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis." *Microbiol Rev* **57**(2): 402-14.
- Dahlke, I. and M. Thomm (2002). "A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment." *Nucleic Acids Res* **30**(3): 701-10.
- De Biase, A., A. J. Macario and E. Conway de Macario (2002). "Effect of heat stress on promoter binding by transcription factors in the cytosol of the archaeon *Methanosarcina mazei*." *Gene* **282**(1-2): 189-97.

- de Jong, W. W., G. J. Caspers and J. A. Leunissen (1998). "Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily." *Int J Biol Macromol* **22**(3-4): 151-62.
- Derre, I., G. Rapoport and T. Msadek (1999). "CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria." *Mol Microbiol* **31**(1): 117-31.
- Edmonds, C. G., P. F. Crain, R. Gupta, T. Hashizume, C. H. Hocart, J. A. Kowalak, S. C. Pomerantz, K. O. Stetter and J. A. McCloskey (1991). "Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria)." *J Bacteriol* **173**(10): 3138-48.
- Eicken, C., M. A. Pennella, X. Chen, K. M. Koshlap, M. L. VanZile, J. C. Sacchettini and D. P. Giedroc (2003). "A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins." *J Mol Biol* **333**(4): 683-95.
- Ellis, R. J. and F. U. Hartl (1996). "Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function." *Faseb J* **10**(1): 20-6.
- Emery, P., B. Durand, B. Mach and W. Reith (1996 a). "RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom." *Nucleic Acids Res* **24**(5): 803-7.
- Emery, P., M. Strubin, K. Hofmann, P. Bucher, B. Mach and W. Reith (1996 b). "A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity." *Mol Cell Biol* **16**(8): 4486-94.
- Engelmann, A. (2002). "Untersuchungen zur Struktur und Funktion eines Regulators der Hitzeschockantwort aus *Pyrococcus furiosus*." Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel.
- Fernandes, M., H. Xiao and J. T. Lis (1994). "Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions." *Nucleic Acids Res* **22**(2): 167-73.
- Fiala, G. and K. O. Stetter (1986). " *Pyrococcus furiosus* sp. nov represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100° C." *Arch. Microbiol.* **145**: 56-61.
- Figueiredo, L., D. Klunker, D. Ang, D. J. Naylor, M. J. Kerner, C. Georgopoulos, F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl (2004). "Functional characterization of an archaeal GroEL/GroES chaperonin system: significance of substrate encapsulation." *J Biol Chem* **279**(2): 1090-9.
- Fiorentino, G., R. Cannio, M. Rossi and S. Bartolucci (2003). "Transcriptional regulation of the gene encoding an alcohol dehydrogenase in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* involves multiple factors and control elements." *J Bacteriol* **185**(13): 3926-34.

- Fogh, R. H., G. Otteleben, H. Ruterjans, M. Schnarr, R. Boelens and R. Kaptein (1994). "Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy." *Embo J* **13**(17): 3936-44.
- Franke, A. (2005). "Untersuchungen zur Funktion des zweiten archaeellen Transkriptionsfaktors B von *Picrococcus furiosus* im Zusammenhang mit der Hitzeschockantwort." Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Frey, G., M. Thomm, B. Brudigam, H. P. Gohl and W. Hausner (1990). "An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor." *Nucleic Acids Res* **18**(6): 1361-7.
- Gajiwala, K. S. and S. K. Burley (2000). "Winged helix proteins." *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 110-6.
- Gajiwala, K. S., H. Chen, F. Cornille, B. P. Roques, W. Reith, B. Mach and S. K. Burley (2000). "Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding." *Nature* **403**(6772): 916-21.
- Galagan, J. E., C. Nusbaum, A. Roy, M. G. Endrizzi, P. Macdonald, W. FitzHugh, S. Calvo, R. Engels, S. Smirnov, D. Atnoor, A. Brown, N. Allen, J. Naylor, N. Stange-Thomann, K. DeArellano, R. Johnson, L. Linton, P. McEwan, K. McKernan, J. Talamas, A. Tirrell, W. Ye, A. Zimmer, R. D. Barber, I. Cann, D. E. Graham, D. A. Grahame, A. M. Guss, R. Hedderich, C. Ingram-Smith, H. C. Kuettner, J. A. Krzycki, J. A. Leigh, W. Li, J. Liu, B. Mukhopadhyay, J. N. Reeve, K. Smith, T. A. Springer, L. A. Umayam, O. White, R. H. White, E. Conway de Macario, J. G. Ferry, K. F. Jarrell, H. Jing, A. J. Macario, I. Paulsen, M. Pritchett, K. R. Sowers, R. V. Swanson, S. H. Zinder, E. Lander, W. W. Metcalf and B. Birren (2002). "The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity." *Genome Res* **12**(4): 532-42.
- Gao, Y., J. O. Thomas, R. L. Chow, G. H. Lee and N. J. Cowan (1992). "A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding." *Cell* **69**(6): 1043-50.
- Geissler, S., K. Siegers and E. Schiebel (1998). "A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin." *Embo J* **17**(4): 952-66.
- Gelfand, M. S., E. V. Koonin and A. A. Mironov (2000). "Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach." *Nucleic Acids Res* **28**(3): 695-705.
- Gerega, A., B. Rockel, J. Peters, T. Tamura, W. Baumeister and P. Zwickl (2005). "VAT, the thermoplasma homolog of mammalian p97/VCP, is an N domain regulated protein unfoldase." *J Biol Chem*.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* **355**(6355): 33-45.

- Glass, J. I., E. J. Lefkowitz, J. S. Glass, C. R. Heiner, E. Y. Chen and G. H. Cassell (2000). "The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*." *Nature* **407**(6805): 757-62.
- Gohl, H. P., B. Grondahl and M. Thomm (1995). "Promoter recognition in archaea is mediated by transcription factors: identification of transcription factor aTFB from *Methanococcus thermolithotrophicus* as archaeal TATA-binding protein." *Nucleic Acids Res* **23**(19): 3837-41.
- Golbik, R., A. N. Lupas, K. K. Koretke, W. Baumeister and J. Peters (1999). "The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding." *Biol Chem* **380**(9): 1049-62.
- Gribaldo, S., V. Lumia, R. Creti, E. C. de Macario, A. Sanangelantoni and P. Cammarano (1999). "Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnaK) gene among Archaea and sequence features of HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein." *J Bacteriol* **181**(2): 434-43.
- Grutter, M. G., R. B. Hawkes and B. W. Matthews (1979). "Molecular basis of thermostability in the lysozyme from bacteriophage T4." *Nature* **277**(5698): 667-9.
- Guerrero, S. A., H. J. Hecht, B. Hofmann, H. Biebl and M. Singh (2001). "Production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems." *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(5-6): 718-23.
- Gupta, R. S. (1995). "Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells." *Mol Microbiol* **15**(1): 1-11.
- Hanzelka, B. L., T. J. Darcy and J. N. Reeve (2001). "TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIEalpha." *J Bacteriol* **183**(5): 1813-8.
- Haslbeck, M., S. Walke, T. Stromer, M. Ehrnsperger, H. E. White, S. Chen, H. R. Saibil and J. Buchner (1999). "Hsp26: a temperature-regulated chaperone." *Embo J* **18**(23): 6744-51.
- Hausner, W., U. Lange and M. Musfeldt (2000). "Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase." *J Biol Chem* **275**(17): 12393-9.
- Hausner, W. and M. Thomm (1993). "Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*." *J Biol Chem* **268**(32): 24047-52.
- Hemmingsen, S. M., C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix and R. J. Ellis (1988). "Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly." *Nature* **333**(6171): 330-4.

- Hendrickson, W. A. (1991). "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation." *Science* **254**(5028): 51-8.
- Hensel, R. and H. König (1988). Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 75-79.
- Hethke, C., A. C. Geerling, W. Hausner, W. M. de Vos and M. Thomm (1996). "A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2369-76.
- Higashibata, H., M. A. Siddiqui, M. Takagi, T. Imanaka and S. Fujiwara (2003). "Surface histidine residue of archaeal histone affects DNA compaction and thermostability." *FEMS Microbiol Lett* **224**(1): 17-22.
- Hofacker, A., K. M. Schmitz, A. Cichonczyk, S. Sartorius-Neef and F. Pfeifer (2004). "GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*." *Microbiology* **150**(Pt 6): 1829-38.
- Horwich, A. L. and K. R. Willison (1993). "Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone, hsp 60 and TF55-TCP1." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **339**(1289): 313-25; discussion 325-6.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser and J. C. Bardwell (1999). "Chaperone activity with a redox switch." *Cell* **96**(3): 341-52.
- Karzai, A. W. and R. McMacken (1996). "A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein." *J Biol Chem* **271**(19): 11236-46.
- Kates, M. (1993). "Membrane lipids of archaea." In: *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*, pp. 261-296, Kates M., Kushner D. J. And Matheson A. T. (eds), Elsevier, Amsterdam.
- Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, S. Yamazaki, Y. Haikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, H. Nakazawa, M. Takamiya, S. Masuda, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, H. Kikuchi and et al. (1999). "Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1." *DNA Res* **6**(2): 83-101, 145-52.
- Kawarabayasi, Y., M. Sawada, H. Horikawa, Y. Haikawa, Y. Hino, S. Yamamoto, M. Sekine, S. Baba, H. Kosugi, A. Hosoyama, Y. Nagai, M. Sakai, K. Ogura, R. Otsuka, H. Nakazawa, M. Takamiya, Y. Ohfuku, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki and H. Kikuchi (1998). "Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (supplement)." *DNA Res* **5**(2): 147-55.
- Kikuchi, A. and K. Asai (1984). "Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA." *Nature* **309**(5970): 677-81.

- Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyripides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. McNeil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese and J. C. Venter (1997). "The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*." *Nature* **390**(6658): 364-70.
- Klunker, D., B. Haas, A. Hirtreiter, L. Figueiredo, D. J. Naylor, G. Pfeifer, V. Muller, U. Deppenmeier, G. Gottschalk, F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl (2003). "Coexistence of group I and group II chaperonins in the archaeon *Methanosarcina mazei*." *J Biol Chem* **278**(35): 33256-67.
- Kojima, K. and H. Nakamoto (2002). "Specific binding of a protein to a novel DNA element in the cyanobacterial small heat-shock protein gene." *Biochem Biophys Res Commun* **297**(3): 616-24.
- Kojima, K. and H. Nakamoto (2005). "Post-transcriptional control of the cyanobacterial hspA heat-shock induction." *Biochem Biophys Res Commun* **331**(2): 583-8.
- Kruger, K., T. Hermann, V. Armbruster and F. Pfeifer (1998). "The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein." *J Mol Biol* **279**(4): 761-71.
- Kubota, H., G. Hynes, A. Carne, A. Ashworth and K. Willison (1994). "Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin." *Curr Biol* **4**(2): 89-99.
- Kubota, H., G. Hynes and K. Willison (1995). "The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol." *Eur J Biochem* **230**(1): 3-16.
- Kuckelkorn, U., C. Knuehl, B. Boes-Fabian, I. Drung and P. M. Klotzel (2000). "The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes." *Biol Chem* **381**(9-10): 1017-23.
- Kunau, W. H., A. Beyer, T. Franken, K. Gotte, M. Marzioch, J. Saidowsky, A. Skaletz-Rorowski and F. F. Wiebel (1993). "Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics." *Biochimie* **75**(3-4): 209-24.
- Kyripides, N. C. and C. A. Ouzounis (1999). "Transcription in archaea." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8545-50.



- Lai, E., K. L. Clark, S. K. Burley and J. E. Darnell, Jr. (1993). "Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or "winged helix" proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10421-3.
- Laksanalamai, P., D. L. Maeder and F. T. Robb (2001). "Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *J Bacteriol* **183**(17): 5198-202.
- Laksanalamai, P. and F. T. Robb (2004). "Small heat shock proteins from extremophiles: a review." *Extremophiles* **8**(1): 1-11.
- Laksanalamai, P., T. A. Whitehead and F. T. Robb (2004). "Minimal protein-folding systems in hyperthermophilic archaea." *Nat Rev Microbiol* **2**(4): 315-24.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(20): 6955-9.
- Langer, D. and W. Zillig (1993). "Putative *tfls* gene of *Sulfolobus acidocaldarius* encoding an archaeal transcription elongation factor is situated directly downstream of the gene for a small subunit of DNA-dependent RNA polymerase." *Nucleic Acids Res* **21**(9): 2251.
- Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein and B. Bukau (1999). "Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5452-7.
- Leroux, M. R., M. Fandrich, D. Klunker, K. Siegers, A. N. Lupas, J. R. Brown, E. Schiebel, C. M. Dobson and F. U. Hartl (1999). "MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin." *Embo J* **18**(23): 6730-43.
- Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos and M. Zylicz (1991). "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2874-8.
- Lim, J., T. Thomas and R. Cavicchioli (2000). "Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*." *J Mol Biol* **297**(3): 553-67.
- Liu, M., B. H. Lee and M. B. Mathews (1999). "Involvement of RFX1 protein in the regulation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter." *J Biol Chem* **274**(22): 15433-9.
- Lopez-Garcia, P. (1996). DNA topoisomerases, temperature adaptation and early diversification of life. In: *Thermophiles: "The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?"* Pp. 201-216, Wiegel J. And Adams M. W. W. (eds), Taylor and Francis, Philadelphia.
- Lundin, V. F., P. C. Stirling, J. Gomez-Reino, J. C. Mwenifumbo, J. M. Obst, J. M. Valpuesta and M. R. Leroux (2004). "Molecular clamp mechanism of substrate

- binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4367-72.
- Macario, A. J. (1995). "Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics." *Int J Clin Lab Res* **25**(2): 59-70.
- Macario, A. J. and E. Conway De Macario (2001). "The molecular chaperone system and other anti-stress mechanisms in archaea." *Front Biosci* **6**: D262-83.
- Macario, A. J. and E. C. de Macario (1999). "The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes." *Genetics* **152**(4): 1277-83.
- Macario, A. J., C. B. Dugan and E. Conway de Macario (1991). "A dnaK homolog in the archaeobacterium *Methanosarcina mazei* S6." *Gene* **108**(1): 133-7.
- Macario, A. J., M. Lange, B. K. Ahring and E. C. De Macario (1999). "Stress genes and proteins in the archaea." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(4): 923-67, table of contents.
- Marguet, E. and P. Forterre (1994). "DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles." *Nucleic Acids Res* **22**(9): 1681-6.
- Martin, J. and F. U. Hartl (1997). "Chaperone-assisted protein folding." *Curr Opin Struct Biol* **7**(1): 41-52.
- Martin, J., A. L. Horwich and F. U. Hartl (1992). "Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60." *Science* **258**(5084): 995-8.
- Martins, L. O., R. Huber, H. Huber, K.O. Stetter, M. Da Costa, and H. Santos (1997). "Organic solutes in hyperthermophilic Archaea." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 896-902.
- Martins, L.O., and Santos, H. (1995). "Accumulation of mannosylglycerate and di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus*." Response to salinity and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3299-3303.
- Maupin-Furlow, J. A., M. A. Gil, I. M. Karadzic, P. A. Kirkland and C. J. Reuter (2004). "Proteasomes: perspectives from the Archaea." *Front Biosci* **9**: 1743-58.
- McCarty, J. S., A. Buchberger, J. Reinstein and B. Bukau (1995). "The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system." *J Mol Biol* **249**(1): 126-37.
- Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid and W. Schumann (1997). "The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*." *Embo J* **16**(15): 4579-90.
- Morby, A. P., J. S. Turner, J. W. Huckle and N. J. Robinson (1993). "SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*:

- identification of a Zn inhibited DNA-protein complex." *Nucleic Acids Res* **21**(4): 921-5.
- Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." *Genes Dev* **12**(24): 3788-96.
- Napoli, A., J. van der Oost, C. W. Sensen, R. L. Charlebois, M. Rossi and M. Ciaramella (1999). "An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter." *J Bacteriol* **181**(5): 1474-80.
- Narberhaus, F. (1999). "Negative regulation of bacterial heat shock genes." *Mol Microbiol* **31**(1): 1-8.
- Narberhaus, F., R. Kaser, A. Nocker and H. Hennecke (1998). "A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression." *Mol Microbiol* **28**(2): 315-23.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge and E. V. Koonin (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." *Genome Res* **9**(1): 27-43.
- Nocker, A., T. Hausherr, S. Balsiger, N. P. Krstulovic, H. Hennecke and F. Narberhaus (2001). "A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes." *Nucleic Acids Res* **29**(23): 4800-7.
- Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." *Genes Cells* **6**(7): 575-97.
- Okochi, M., T. Nomura, T. Zako, T. Arakawa, R. Iizuka, H. Ueda, T. Funatsu, M. Leroux and M. Yohda (2004). "Kinetics and binding sites for interaction of the prefoldin with a group II chaperonin: contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in the archaeal prefoldin." *J Biol Chem* **279**(30): 31788-95.
- Okochi, M., T. Yoshida, T. Maruyama, Y. Kawarabayasi, H. Kikuchi and M. Yohda (2002). "Pyrococcus prefoldin stabilizes protein-folding intermediates and transfers them to chaperonins for correct folding." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(4): 769-74.
- Pak, M. and S. Wickner (1997). "Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 4901-6.
- Palmer, J. R., D. K. Thompson, W. C. Ray, and C. J. Daniels. 1997. Occurrence of multiple TATA binding protein and TFIIB eucaryal-like transcription factors in the archaeon *Haloferax volcanii* and evidence for their differential regulation, p. 330. In *Abstracts of the 97<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for microbiology 1997*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- 
- Parsell, D. A., A. S. Kowal, M. A. Singer and S. Lindquist (1994). "Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104." *Nature* **372**(6505): 475-8.
- Parsell, D. A. and S. Lindquist (1993). "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins." *Annu Rev Genet* **27**: 437-96.
- Perez-Rueda, E. and J. Collado-Vides (2000). "The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12." *Nucleic Acids Res* **28**(8): 1838-47.
- Perisic, O., H. Xiao and J. T. Lis (1989). "Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit." *Cell* **59**(5): 797-806.
- Phadtare, S., J. Alsina and M. Inouye (1999). "Cold-shock response and cold-shock proteins." *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 175-80.
- Phipps, B. M., A. Hoffmann, K. O. Stetter and W. Baumeister (1991). "A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria." *Embo J* **10**(7): 1711-22.
- Pinto, M., M. Morange and O. Bensaude (1991). "Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes." *J Biol Chem* **266**(21): 13941-6.
- Poole, F. L., 2nd, B. A. Gerwe, R. C. Hopkins, G. J. Schut, M. V. Weinberg, F. E. Jenney, Jr. and M. W. Adams (2005). "Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes." *J Bacteriol* **187**(21): 7325-32.
- Ranson, N. A., H. E. White and H. R. Saibil (1998). "Chaperonins." *Biochem J* **333** (Pt 2): 233-42.
- Reinhold, W., L. Emens, A. Itkes, M. Blake, I. Ichinose and M. Zajac-Kaye (1995). "The myc intron-binding polypeptide associates with RFX1 in vivo and binds to the major histocompatibility complex class II promoter region, to the hepatitis B virus enhancer, and to regulatory regions of several distinct viral genes." *Mol Cell Biol* **15**(6): 3041-8.
- Reith, W., C. Ucla, E. Barras, A. Gaud, B. Durand, C. Herrero-Sanchez, M. Kobr and B. Mach (1994). "RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins." *Mol Cell Biol* **14**(2): 1230-44.
- Ren, B., F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, J. Zeitlinger, J. Schreiber, N. Hannett, E. Kanin, T. L. Volkert, C. J. Wilson, S. P. Bell and R. A. Young (2000). "Genome-wide location and function of DNA binding proteins." *Science* **290**(5500): 2306-9.

- 
- Ritossa F.M. (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.
- Rohlin, L., J. D. Trent, K. Salmon, U. Kim, R. P. Gunsalus and J. C. Liao (2005). "Heat shock response of *Archaeoglobus fulgidus*." *J Bacteriol* **187**(17): 6046-57.
- Rossmann, M. G., D. M. Blow. 1962. "The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit." *Acta Crystallogr.* **15**:24-31.
- Ruepp, A., C. Eckerskorn, M. Bogyo and W. Baumeister (1998). "Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*." *FEBS Lett* **425**(1): 87-90.
- Safo, M. K., Q. Zhao, T. P. Ko, F. N. Musayev, H. Robinson, N. Scarsdale, A. H. Wang and G. L. Archer (2005). "Crystal structures of the Blal repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the *bla* and *mec* operons." *J Bacteriol* **187**(5): 1833-44.
- Sambrock, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sarge, K. D., V. Zimarino, K. Holm, C. Wu and R. I. Morimoto (1991). "Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability." *Genes Dev* **5**(10): 1902-11.
- Satyal, S. H., D. Chen, S. G. Fox, J. M. Kramer and R. I. Morimoto (1998). "Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1." *Genes Dev* **12**(13): 1962-74.
- Scandurra, R., V. Consalvi, R. Chiaraluce, L. Politi and P. C. Engel (1998). "Protein thermostability in extremophiles." *Biochimie* **80**(11): 933-41.
- Scandurra, R., V. Consalvi, R. Chiaraluce, L. Politi and P. C. Engel (2000). "Protein stability in extremophilic archaea." *Front Biosci* **5**: D787-95.
- Scholz, S., J. Sonnenbichler, W. Schafer and R. Hensel (1992). "Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*." *FEBS Lett* **306**(2-3): 239-42.
- Sengupta, P., Y. Xu, L. Wang, R. Widom and B. D. Smith (2005). "Collagen alpha1(I) gene (COL1A1) is repressed by RFX family." *J Biol Chem* **280**(22): 21004-14.
- Sengupta, P. K., M. Ehrlich and B. D. Smith (1999). "A methylation-responsive MDBP/RFX site is in the first exon of the collagen alpha2(I) promoter." *J Biol Chem* **274**(51): 36649-55.

- Sengupta, P. K., J. Fargo and B. D. Smith (2002). "The RFX family interacts at the collagen (COL1A2) start site and represses transcription." *J Biol Chem* **277**(28): 24926-37.
- Servant, P., C. Grandvalet and P. Mazodier (2000). "The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3538-43.
- Servant, P. and P. Mazodier (1996). "Heat induction of hsp18 gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation." *J Bacteriol* **178**(24): 7031-6.
- Shockley, K. R., D. E. Ward, S. R. Chhabra, S. B. Connors, C. I. Montero and R. M. Kelly (2003). "Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Appl Environ Microbiol* **69**(4): 2365-71.
- Siegrist, C. A., B. Durand, P. Emery, E. David, P. Hearing, B. Mach and W. Reith (1993). "RFX1 is identical to enhancer factor C and functions as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer." *Mol Cell Biol* **13**(10): 6375-84.
- Smith, D. R., L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, J. N. Reeve and et al. (1997). "Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics." *J Bacteriol* **179**(22): 7135-55.
- Sorger, P. K. and H. R. Pelham (1988). "Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation." *Cell* **54**(6): 855-64.
- Steimle, V., B. Durand, E. Barras, M. Zufferey, M. R. Hadam, B. Mach and W. Reith (1995). "A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome)." *Genes Dev* **9**(9): 1021-32.
- Sterner, R. and W. Liebl (2001). "Thermophilic adaptation of proteins." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**(1): 39-106.
- Stetter, K.O. (1990). Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 149-158.
- Swindells, M. B. (1995). "Identification of a common fold in the replication terminator protein suggests a possible mode for DNA binding." *Trends Biochem Sci* **20**(8): 300-2.
- Szabo, A., T. Langer, H. Schroder, J. Flanagan, B. Bukau and F. U. Hartl (1994). "The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10345-9.

- 
- Thomm, M. (1996). "Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation." *FEMS Microbiol Rev* **18**(2-3): 159-71.
- Thomm, M., W. Hausner, and C. Hethke. (1994). "Transcription factors and termination of transcription in *Methanococcus*." *System. Appl. Microbiol.* **16**: 648-655.
- Thompson, D. K., J. R. Palmer and C. J. Daniels (1999). "Expression and heat-responsive regulation of a TFIIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*." *Mol Microbiol* **33**(5): 1081-92.
- Trent, J. D., M. Gabrielsen, B. Jensen, J. Neuhard and J. Olsen (1994). "Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains." *J Bacteriol* **176**(19): 6148-52.
- Trent, J. D., E. Nimmesgern, J. S. Wall, F. U. Hartl and A. L. Horwich (1991). "A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1." *Nature* **354**(6353): 490-3.
- Vainberg, I. E., S. A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. L. Klein and N. J. Cowan (1998). "Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin." *Cell* **93**(5): 863-73.
- Van Duyne, G. D., R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber and J. Clardy (1993). "Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin." *J Mol Biol* **229**(1): 105-24.
- Vierke, G. (2001). "Untersuchungen zur Regulation der Hitzeschock-Antwort bei *Pyrococcus furiosus*." Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel.
- Vierke, G., A. Engelmann, C. Hebbeln and M. Thomm (2003). "A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response." *J Biol Chem* **278**(1): 18-26.
- Volker, C. and A. N. Lupas (2002). "Molecular evolution of proteasomes." *Curr Top Microbiol Immunol* **268**: 1-22.
- Waldmann, T., A. Lupas, J. Kellermann, J. Peters and W. Baumeister (1995). "Primary structure of the thermosome from *Thermoplasma acidophilum*." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(2): 119-26.
- Waldminghaus, T., A. Fippinger, J. Alfsmann and F. Narberhaus (2005). "RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria." *Biol Chem* **386**(12): 1279-86.
- Ward, D. E., K. R. Shockley, L. S. Chang, R. D. Levy, J. K. Michel, S. B. Connors and R. M. Kelly (2002). "Proteolysis in hyperthermophilic microorganisms." *Archaea* **1**(1): 63-74.

- 
- Wenke, A.-K. (2004). "Untersuchungen zur Funktion des Hitzeschockregulators Phr aus *Pyrococcus furiosus*." Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel.
- Westwood, J. T., J. Clos and C. Wu (1991). "Stress-induced oligomerization and chromosomal relocation of heat-shock factor." *Nature* **353**(6347): 822-7.
- Wu, C. (1995). "Heat shock transcription factors: structure and regulation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-69.
- Wu, C., S. Wilson, B. Walker, I. Dawid, T. Paisley, V. Zimarino and H. Ueda (1987). "Purification and properties of *Drosophila* heat shock activator protein." *Science* **238**(4831): 1247-53.
- Wu, S. Y. and M. McLeod (1995). "The sak1+ gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes an RFX family DNA-binding protein that positively regulates cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1479-88.
- Zillig, W., I. Holz, H.-P. Klenk, J. Trent, S. Wunderl, D. Janekovic, E. Imself and B. Haas (1987). "*Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, Thermococcales." *System. Appl. Microbiol.* **9**: 62-70.
- Zuber, U. and W. Schumann (1994). "CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **176**(5): 1359-63.



## VIII Anhang

### 1. Abkürzungen

Å	Angström
Abb	Abbildung
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Ak	Antikörper
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRE	TFIIB bzw. TFB Erkennungs Element
BSA	Bovine serum albumin
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CIRCE	controlling inverted repeat of chaperone expression
ddNTP	Di-Desoxynukleotidtriphosphat
DIP	Dimyoinositolphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
et al.	et alii
HrcA	heat regulation at CIRCE
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HTH	helix turn helix
IgG	Immunglobulin G

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen (-paare)
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
MAD	multiwavelength anomalous dispersion
Mb	Megabasen
min	Minute
mRNA	messenger RNA
<i>M. thermoautotrophicus</i>	<i>Methanothermococcus thermoautotrophicus</i>
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. horikoshii</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
Phr	Pyrococcus heat shock regulator
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxydase
poly[d(I-C)]	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
p.a.	pro analysi
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFX	regulator factor x
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
ROSE	repression of heat shock gene expression
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SeMet	Selenomethionin

sHsp	kleines Hitzeschockprotein
SPR	surface plasmon resonance
Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
TFE	Transkriptionsfaktor E
TFIIE	Transkriptionsfaktor E der RNA Polymerase II
TFIIF	Transkriptionsfaktor F der RNA Polymerase II
TFIIS	Transkriptionsfaktor IIS
TFS	Transkriptionsfaktor S
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure für die Aminosäure Valin
U	Unit
wHTH	winged helix turn helix

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin

Symbole für die Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
K	Lys	Lysin	V	Val	Valin
L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan
			Y	Tyr	Tyrosin

## 2. Danksagung

Herrn Professor Michael Thomm möchte ich für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken. Sein stetiges Interesse und seine große Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Teil dieser Arbeit entstand in Kooperation mit Professor Rudolf Ladenstein und Dr. Wei Liu aus Schweden, denen ich sehr für die hervorragende Zusammenarbeit danken möchte.

Bei der Anzucht von *Pyrococcus*-Zellen im großen Maßstab haben mich freundlicherweise Holger Preidel in Kiel sowie Renate Richau, Thomas Hader und Konrad Eichinger in Regensburg tatkräftig unterstützt. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Wolfgang Forster danke ich für die Aufreinigung von Phr in großen Mengen.

An Patrizia, die mich während der gesamten Arbeit begleitet hat, geht ein besonderer Dank. Sie stand jederzeit für wertvolle Diskussionen zur Verfügung und sorgte außerdem für die notwendige Abwechslung.

Ich danke weiterhin allen ehemaligen Kollegen des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie in Kiel für die schöne Zeit. Auch den derzeitigen Kollegen in Regensburg danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir mit dem Korrekturlesen meiner Arbeit geholfen oder mich in irgendeiner anderen Form beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

### **3. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Vierke, G., A. Engelmann, C. Hebbeln and M. Thomm (2003). "A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response." J Biol Chem 278(1): 18-26.

Die Proteinstruktur von Phr ist bei der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) unter der Zugangsnummer 1XNP hinterlegt.

Regensburg, im Februar 2006